RESONANZ-RAMAN-STREUUNG AN PHOTOSYNTHESEPIGMENTEN *IN VITRO* UND *IN VIVO*

WOLF-DIETER WAGNER

Resonanz – Raman – Streuung an Photosynthesepigmenten

in vitro und *in vivo*

Dissertation
der
Fakultät für Physik
der
Ludwig – Maximilians – Universität
München

vorgelegt von
Wolf – Dieter Wagner
aus
Gelsenkirchen – Buer

München, den 3. Juni 1986

1. Gutachter : Prof. W. Waidelich

2. Gutachter : Prof. J. Brandmüller

Tag der mündlichen Prüfung : 25. Juli 1986

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Vorwort		
Zusammenfassung		
1.	**Einleitung**	1
2.	**Theoretische Grundlagen**	3
2.1.	Der Raman – Effekt	3
2.1.1.	Raman – Streuintensitäten	4
2.1.2.	Albrechts Näherungen	6
2.1.3.	Der Depolarisationsgrad	10
2.1.4.	Raman – Anregungsprofile und das Absorptions – spektrum	13
2.2.	Die Photosynthese	16
2.2.1.	Bruttoreaktion und das Zwei – Stufen – Modell	16
2.2.2.	Der Aufbau der Chloroplasten	18
2.2.3.	Die Antennenpigmente	20
2.2.3.1.	Chlorophylle	21
2.2.3.2.	Carotinoide	24
3.	**Probenpräparation**	26
3.1.	Pigmente *in vitro*	26
3.2.	Algenzucht	26
3.3.	Einfriervorgang	27
4.	**Experimentelle Methoden**	29
4.1.	Absorptionsmessungen	29
4.2.	Die Raman – Apparatur	29
4.3.	Raman – Streuanordnungen und Probentechniken	32
4.3.1.	Die Methode des streifenden Einfalls	32
4.3.2.	Durchflußtechnik	33

4.3.3. Zweikanal – Oberflächenscanning – Technik 34

5. Resonanz – Raman(RR) – Spektren von Photosynthesepigmenten *in vitro* **36**

5.1. Die Chlorine Chlorophyll a und Chlorophyll b 36

5.2. Das Porphyrin Chlorophyll c 39

5.3. β – Carotin 48

6. *In vivo* Resonanz – Raman – Untersuchungen **51**

6.1. Die Besetzung der Schwingungsniveaus der Carotinoide in stoffwechselaktiven *Chlorella* – Zellen 51

6.2. Selektive Beobachtung von Photosynthesepigmenten in RR – Spektren von intakten Zellen bei tiefen Temperaturen 57

6.2.1. *Grünalgen* 57

6.2.2. *Kieselalgen* 63

6.3. Untersuchungen zu einem Phasenübergang in lebenden *Chlorella* – Zellen 69

6.3.1. Korrektur von Linienzuordnungen im RR – Spektrum von *Chlorella pyrenoidosa* (*fusca*) 70

6.3.2. Das Aufwärmverhalten von RR – Intensitäten *in vivo* 72

6.3.3. RR – Spektren verschiedener *Chlorella* – Farbmutanten 82

6.3.4. Schlußfolgerungen 87

7. Registrierung von Raman – Anregungsprofilen(REPs) bei tiefen Temperaturen **88**

7.1. Kontrollmessungen zur Zweikanalregistrierung mit Intensitäts – referenz 90

7.2. Korrektur der Reabsorption 92

7.3. REPs von β – Carotin *in vitro* 94

7.4. REPs von Algenpigmenten *in vivo* 97

Literaturverzeichnis **105**

Anhang A: Fortran – Programm zur Berechnung von REPs 113

Anhang B: Schaltplan zur Kanalumschaltung des Photonenzählers 120

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

Car	Carotinoid
Chl a	Chlorophyll a
Chl b	Chlorophyll b
Chl c	Chlorophyll c
FePP	Eisenprotoporphyrin
FC	Franck – Condon
MO	Molekülorbital
NiOEP	Nickeloktaäthylporphyrin
OMA	optical multichannel analyzer
PS	Photosynthese
RC	Reaktionszentren
REP	Raman – Anregungsprofil
RR	Resonanz – Raman
UV	Ultraviolett

Vorwort

Pigmente spielen überall in der belebten Natur eine wichtige Rolle. Unter ihnen nehmen die Porphyrinderivate, zu denen unter anderen der Blutfarbstoff und die Chlorophylle zählen, eine Sonderstellung ein. Als zentrale Reaktionspartner bei der Photosynthese (PS) können Chlorophylle *in vivo* Informationen über den augenblicklichen Zustand von PS – Zellen preisgeben. Gerade im Hinblick auf die besorgniserregende Zunahme des Algenwachstums in Folge der Gewässerverschmutzung gewinnt dieser Aspekt an Bedeutung. Dies ist mit ein Grund für das große Interesse der biophysikalischen und der biochemischen Forschung an einer möglichst genauen Aufklärung der Bindungsverhältnisse biologisch bedeutsamer Pigmente *in vitro* und vor allem *in vivo*.

IR – Techniken sind zwar zur Untersuchung der Schwingungsstruktur dieser komplexen Moleküle *in vitro* gut geeignet, versagen jedoch *in vivo* wegen der starken IR – Absorption des Zellwassers. Hier erweisen sich die Eigenschaften der Resonanz – Raman(RR) – Spektroskopie als sehr vorteilhaft. Die außerordentliche Selektivität dieser spektroskopischen Methode gestattet es, aus der molekularen Vielfalt lebender Zellen einzelne Molekülschwingungen bestimmter zelltypischer Pigmente zu beobachten und deren Veränderungen aufzuzeichnen. Damit kann die RR – Spektroskopie wertvolle Informationen *in vivo* liefern, die weit über die Möglichkeiten der Fluoreszenz – und der Absorptionsspektroskopie hinausgehen. Die nachfolgend vorgestellte Arbeit leistet hierzu einen Beitrag.

Zusammenfassung

Die Einleitung gibt eine Literaturübersicht und führt auf die Problemstellung hin. Anschließend wird in Kap. 2 auf die physikalischen und biologischen Grundlagen des bearbeiteten Sachgebiets eingegangen:

1. Die Theorie der Raman – Streuintensitäten wird unter besonderer Berücksichtigung resonanznaher Anregung dargestellt. Nach einer Vereinfachung der Intensitätsformel durch die von Albrecht vorgeschlagenen Näherungen wird gezeigt, wie sich in einfachen Fällen die sog. Raman – Anregungsprofile aus dem Absorptionsspektrum berechnen lassen.

2. Bei der Beschreibung der Photosynthese liegt der Schwerpunkt auf Funktion und physikalischen Eigenschaften der Antennenpigmente im Chloroplasten, welche die Lichtabsorption lebender Zellen bestimmen. Die Absorptionsspektren der wichtigsten Chlorophylle und des β – Carotins werden diskutiert.

Die spektroskopische Untersuchung biologischer Objekte erfordert eine spezielle Probenvorbereitung. Es muß dafür Sorge getragen werden, daß sich die Probe während des Meßvorgangs nicht verändert. Da bei Resonanz – Raman – Streuung die Laseranregung in die Absorptionsmaxima der Pigmente erfolgt, sind Maßnahmen zur Probenentlastung unbedingt erforderlich:

3. Für die Anzucht einzelliger Algen in Flüssigkeitskulturen wurde eigens eine Zuchtanlage aufgebaut.

4. Mit einer Durchflußtechnik ließen sich stoffwechselaktive Zellen im Raman – Effekt untersuchen. Dabei wurde Zellsuspension in einem geschlossenen Kreislauf aus einem Zuchtgefäß durch eine Küvette gepumpt.

5. Die Auflösung der RR – Spektren ließ sich wesentlich steigern, wenn die

Pigmentproben bei tiefen Temperaturen angeregt wurden. Dazu stand ein Verdampferkryostat zur Verfügung, der wahlweise mit flüssigem He oder N_2 betrieben werden konnte.

6. Da bei längerer intensiver Lasereinstrahlung trotz Kühlung Veränderungen der Algenzellen eintreten können, wurde zusätzlich eine Oberflächenscanning – Technik eingesetzt. Der Ausbau zu einem Zweikanalverfahren ermöglichte dann die Registrierung von Differenzspektren und die Aufnahme von *in vivo* Anregungsprofilen gegen eine nichtresonante Referenz bei tiefen Temperaturen.

Für die Beurteilung von RR – Spektren ganzer photosynthetisierender Zellen ist die genaue Kenntnis der einzelnen Pigmentspektren unumgänglich. Daher wurden zunächst Raman – Messungen *in vitro* durchgeführt:

7. Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b), die Hauptantennenpigmente grüner Pflanzen und *Grünalgen* wurden in acetonischer Lösung bei 80 K bzw 22 K untersucht, ebenso β – Carotin als wichtigster Vertreter der Carotinoide.

8. Das charakteristische Hilfspigment der *Braun* – und *Kieselalgen* Chlorophyll c (Chl c) konnte erstmals im RR – Effekt beobachtet werden. Aufgrund der Zweikanalregistrierung ließ sich der Beitrag des Lösungsmittels Aceton eliminieren. Depolarisationsgradmessungen und Vergleiche mit den RR – Spektren einfacher Porphyrine gestatteten eine weitgehende Zuordnung der beobachteten Raman – Frequenzen zu ebenen Molekülschwingungen. Wegen der Anregung im Bereich der Soret – Absorption traten die Moden der totalsymmetrischen Rasse A_{1g} (Punktpruppe D_{4h}) im RR – Spektrum am stärksten hervor.

Die *in vivo* RR – Untersuchungen wurden an typischen Vertretern der grünen (*Grünalgen*) und der braunen (*Kieselalgen*) Entwicklungslinie der Pflanzen durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Fragestellungen ins Auge gefaßt:

10. Ein Vergleich der Stokes und Anti – Stokes Intensitäten aus dem Zimmertemperatur RR – Spektrum der *Grünalge Chlorella pyrenoidosa* ergab nach der Berücksichtigung der spektralen Apparateempfindlichkeit und des ω^4 – Gesetzes keine Anzeichen für eine auf den Zellmetabolismus zurückzuführende Abweichung von der thermischen Besetzung der Schwingungszustände.

11. In verschieden angeregten RR – Spektren von *Kieselalgen* ließen sich bei tiefen Temperaturen erstmals Chl a (441,6 nm) und Chl c (457,5 nm) selektiv beobachten. Für Antennen – Chl a konnte gezeigt werden, daß es in monomerer Form an die Antennenkomplexe der Photosynthesemembran gebunden ist. Chl c ließ sich anhand der intensivsten A_{1g}–Moden *in vivo* identifizieren. Zwischen Salzwasser – und Süßwasser – *Kieselalgen* war kein Unterschied in den Raman – Frequenzen feststellbar.

12. Die Ursache eines an *Chlorella pyrenoidosa* im Raman – Effekt beobachteten Phasenübergangs konnte geklärt werden. Es handelt sich um eine Veränderung der Antennenkomplexe, die durch intensive Lichteinwirkung im Laserfokus hervorgerufen wird. Die Abhängigkeit des Effekts von der Erregerintensität wurde untersucht. Genauere Informationen über die Art des berichteten Effekts erbrachten Fluoreszenzmessungen und ein Vergleich der RR – Spektren verschiedener Pigmentmutanten von *Chlorella*.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurden RR – Spektren *in vivo* und *in vitro* mit 11 verschiedenen Erregerfrequenzen ω_0 registriert und die Abhängigkeit der Linienintensitäten von ω_0 – sog. Raman – Anregungsprofile (REPs) – ausgewertet:

13. Um die Zuverlässigkeit des neuen Zweikanal – Meßverfahrens zu testen, wurden REPs von β – Carotin in Isopentan bestimmt. Dabei konnten die Ergebnisse früherer Arbeiten, die mit interner Referenz durchgeführt worden waren reproduziert werden. Die Übereinstimmung zwischen experimentell ermittelten REPs und den aus dem Absorptions-

spektrum berechneten ist gut. Für die numerische Berechnung nach dem in 2.1.4. beschriebenen Verfahren wurde ein Fortran – Computerprogramm (TREPS) erstellt.

14. In gleicher Weise konnten REPs der Chloroplastenpigmente an ganzen *Grün* – und *Kieselalgen* – Zellen bestimmt werden. Der Vergleich mit dem jeweiligen Absorptionsspektrum macht deutlich, daß eine Auswertung von REPs Rückschlüsse auf die Einzelpigmentabsorptionen *in vivo* zuläßt. So werden die 0 – 0 und 0 – 1 Übergänge des β – Carotins sowohl in *Grün* – als auch in *Kieselalgen* erkennbar. Für *Chlorella* kann durch REPs die Chl b Absorption *in vivo* bei 476 nm bestätigt werden. REPs von Chl c in *Phaeodactylum* ergeben einen *in vivo* Absorptionsübergang um 460 nm. Diese Information vermag das Absorptionsspektrum allein nicht zu liefern. Daneben wird durch die Anregungsprofile der Carotinoide in *Phaeodactylum* eine Absorptionsbande des Fucoxanthins bei 520 nm in den REPs der Carotinoide angedeutet. Resonanz – Raman – Versuche, durchgeführt mit durchstimmbaren Lasern über einen größeren Erregerwellenlängenbereich, könnten hier weitere wertvolle Aussagen liefern.

1. Einleitung

Obwohl die Resonanzverstärkung des Raman - Effekts (Raman 1928) bereits im Jahre 1947 von Shorygin nachgewiesen wurde, dauerte es bis Anfang der 70er Jahre ehe erste Resonanz - Raman(RR) - Untersuchungen an biologisch bedeutsamen Molekülkomplexen veröffentlicht wurden. Unabhängig voneinander berichteten Strekas und Spiro (1972) und Brunner et al. (1972) über RR - Spektren von Hämproteinen und gleichzeitig Lutz (1972) über RR - Spektren von Chlorophyllen a und b. Als Gründe für diese große Zeitspanne sind, neben der zögernden Entwicklung der interdisziplinären Forschung, vor allem experimentelle Schwierigkeiten, hervorgerufen durch die Photolabilität der biologischen Farbstoffe und den störenden Einfluß der Lumineszenz bei der Beobachtung von RR - Spektren, zu nennen.

Nachdem es gelungen war einige dieser experimentellen Probleme zu überwinden (Tieftemperaturmessungen, dynamische Probentechnik usw.), stellte sich heraus, daß die RR - Spektroskopie wegen ihrer großen Signalverstärkung ($10^4 - 10^6$) gegenüber normaler Raman - Streuung und der damit verbundenen außerordentlichen Selektivität für Untersuchungen an Pigmenten *in vivo* hervorragend geeignet ist. 1973 zeigten Lutz und Breton, daß sich die RR - Spektren von Chlorophyll a (Chl a) und Chlorophyll b (Chl b) an ganzen Chloroplasten grüner Pflanzen trotz des starken Beitrags der Carotinoide (Car) selektiv beobachten lassen, wenn die Erregerwellenlänge jeweils in der Nähe eines Absorptionsmaximums liegt. Damit konnte nachgewiesen werden (Lutz 1977), daß die beobachteten Antennenpigmente Chl a der Photosynthese (PS) - Membran in monomerer Form an Proteine gebunden vorliegen. Weitere RR - Untersuchungen an Reaktionszentren photosynthetisierender Bakterien (Lutz 1980) folgten.

Trotz ihrer vielfältigen Möglichkeiten wurde die RR - Spektroskopie im Rahmen der PS - Forschung erst an wenigen Chlorophyllen *in vitro* und *in vivo* (Lutz 1984) eingesetzt. Insbesondere fehlen bisher Raman - Daten über Chlorophylle *mariner Algen* und *Kieselalgen*. Zwar untersuchten Brahma et al. (1983) *Diatomeen* im Raman - Effekt um damit eine Methode für die rasche Zellidentifizierung zu realisieren. Da sie ihre Messungen bei Zimmertemperatur durchführten, konnten sie abgesehen von einer schwachen Bande bei 1360 cm^{-1} nur die starken Carotinoid - Linien an ganzen Zellen der *Kieselalgen* auflösen.

Diese Spezies repräsentieren neben der grünen Entwicklungslinie der Pflanzen , zu der Landpflanzen und *Grünalgen* zählen, einen zweiten artenreichen Evolutionsast, auf den mehr als 60 % der PS – Aktivität auf der Erde entfällt. Charakteristisch für den PS – Apparat dieser Organismen ist das Auftreten des Chlorophyll c (Chl c) als Antennenpigment. Aufgrund seiner Absorptionseigenschaften ist Chl c *in vivo* absorptionsspektroskopisch kaum beobachtbar (Govindjee und Braun 1974). In der vorliegenden Arbeit werden erstmals RR – Spektren von Chl c *in vitro* und *in vivo* gezeigt, und es werden Bandenzuordnungen getroffen.

Neben den Chlorophyllen liegen Carotinoide in hohen Konzentrationen in PS – Membranen vor. Sie zeigen bei Beleuchtung mit blau – grünem Licht eine hohe Resonanzverstärkung und wurden bereits 1970 (Gill et al) *in vivo* Raman – spektroskopisch untersucht. Drissler (1980) beobachtete drastische Intensitätsänderungen im RR – Spektrum der Carotinoide von *Grünalgen* als er eine Probe von 10 K bis Raumtemperatur aufwärmte. Als mögliche Erklärung schlug er einen Phasenübergang in der PS – Membran vor. Dieser Effekt wird in Kap. 6.3. der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht.

Während die Frequenzen der Raman – Linien Aussagen über den elektronischen Grundzustand der streuenden Pigmentmoleküle zulassen, beinhalten die Linienintensitäten Informationen über elektronisch angeregte Zustände. Mit den Fortschritten bei der theoretischen Beschreibung der Raman – Anregungs – Profile (REPs) und deren Zusammenhang mit dem Absorptionsspektrum (Hassing und Sonnich Mortensen 1980; Stallard et al. 1984) gewinnt die Messung von REPs an Pigmenten immer mehr Interesse. *In vivo* kann die Registrierung von REPs die Zuordnung der Raman – Linien zu den verschiedenen Pigmenten unterstützen. Daneben besteht unter Umständen die Möglichkeit aus den Anregungsprofilen auf die selektiven Pigmentabsorptionen *in vivo* zu schließen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine experimentelle Anordnung entwickelt, die die Aufnahme solcher REPs bei Tieftemperatur gegen eine nichtresonante Intensitätsreferenz gestattet. Die damit gewonnenen Anregungsprofile der Carotinoide und Chlorophylle in *Grünalgen* und *Kieselalgen* werden in Kap. 7 diskutiert.

2. Theoretische Grundlagen

Der erste Teil dieses Kapitels beschäftigt sich mit der Theorie des Raman – Effekts. Es wird ein Näherungsverfahren für die Berechnung der Raman – Streuintensitäten im Fall strenger Resonanz beschrieben, und der Zusammenhang zwischen Raman – Anregungsprofilen und dem Absorptionsspektrum dargestellt.

2.1. Der Raman – Effekt

Durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht werden in Molekülen verschiedene physikalische Prozesse ausgelöst. Neben der, gegenüber dem monochromatischen Erregerlicht unverschobenen, Rayleigh – Streuung lassen sich im Streulicht auch frequenzverschobene Anteile beobachten, hervorgerufen durch den Raman – Effekt und die Fluoreszenz (Abb. 2.1). Während letztere stets zu

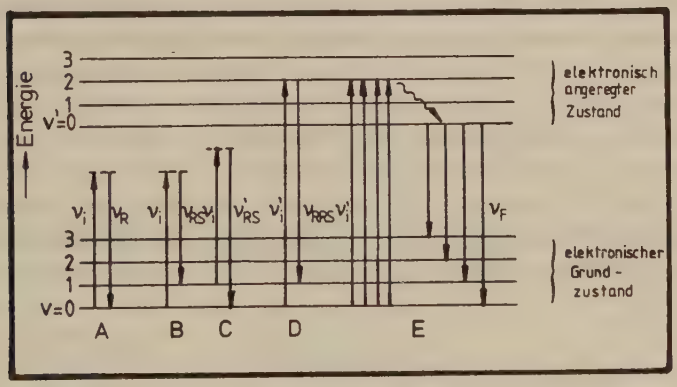


Abb. 2.1.: Verschiedene Möglichkeiten der Streuung von Lichtquanten (ν_i) an Molekülen; v, v' = Schwingungsquantenzahlen, A: Rayleigh-Streuung ($\nu_i \rightarrow \nu_R$); B und C: gewöhnliche Raman-Streuung ($\nu_i \rightarrow \nu_{RS}$, ν'_{RS}) Stokes, Antistokes; D: Resonanz-Raman-Streuung ($\nu'_i \rightarrow \nu_{RRS}$); E: Fluoreszenz ($\nu'_i \rightarrow \nu_F$)

einer breiten langwellig verschobenen Frequenzbande führt, treten bei Raman – Streuung sowohl energieärmere (Stokes) als auch energiereichere (Anti – Stokes) schmalbandige Linien auf.

Beim gewöhnlichen Raman – Effekt erfolgt die Anregung nicht in einen Eigenzustand des Moleküls. Die Lebendsdauer des angeregten Zwischenzustands, auch virtueller Zustand genannt, liegt bei etwa 10^{-15} sec. Im sog. Resonanz – Raman – Effekt fällt dieser Zustand mit einem elektronisch angeregten Zustand ($t \approx 10^{-8}$sec) zusammen. Dabei können Resonanzverstärkungen bis 10^5 auftreten. Aus Abb. 2.1 ist ersichtlich, daß die Fluoreszenz ($t \approx 10^{-8}$sec) einen Konkurrenzprozess zur RR – Streuung darstellt, welcher die Beobachtung von RR – Linien in der Praxis oft verhindert.

2.1.1. Raman – Streuintensitäten

Im Resonanzfall sind die Voraussetzungen für Placzeks halbklassische Polarisierbarkeitstheorie (1934) nicht erfüllt. Daher werden die Streuintensitäten quantenmechanisch beschrieben. Der durch zeitabhängige Störungsrechnung ermittelte Ausdruck für die in den gesamten Raum abgestrahlte Raman – Streuintensität I_f des zufällig orientierten Moleküls lautet (Behringer 1958):

$$(1) \qquad I_f = \frac{8\pi}{9c^4} I_0 \omega_f^4 \sum_{\rho\sigma} |(\alpha_{\rho\sigma})_{i,f}|^2$$

Für die $\rho\sigma$ – Komponente (ρ,σ = x,y,z kartesisch, raumfest) des Polarisierbarkeitstensors $(\alpha_{\rho\sigma})_{i,f}$ gilt:

$$(2) \qquad (\alpha_{\rho\sigma})_{i,f} = \sum_r \left(\frac{\langle f|R_\rho|r\rangle\langle r|R_\sigma|i\rangle}{E_r - E_i - \hbar\omega_0 - i\Gamma_r} + \frac{\langle f|R_\sigma|r\rangle\langle r|R_\rho|i\rangle}{E_r - E_f + \hbar\omega_0 + i\Gamma_r} \right)$$

Darin bedeuten I_0 und ω_0 die Intensität und die Frequenz des Erregerlichts, $|i\rangle, |f\rangle$ und $|r\rangle$ die molekularen Eigenfunktionen des Anfangs – ,End – und

eines beliebigen Zwischenzustands mit den Energieeigenwerten E_i, E_f und E_r, Γ_r die homogene Dämpfungskonstante des Zustands $|r\rangle$ und R_ρ, R_σ die Komponenten des elektrischen Dipolmomentoperators. Charakteristisch für Lichtstreuung ist die Abhängigkeit der Streuintensität von der vierten Potenz der Frequenz des Streulichts ω_f. Die Gleichungen (1) und (2) beschreiben gleichermaßen die Intensität der

Rayleigh – Streuung	$\omega_f = \omega_0$	mit	$i = f$
Raman – Stokes – Streuung	$\omega_f = \omega_0 - \omega_a$	mit	$i \neq f$
Raman – Anti – Stokes – Streuung	$\omega_f = \omega_0 + \omega_a$	mit	$i \neq f$,

bezogen auf eine Molekülschwingung der Frequenz ω_a (siehe Abb. 2.2). Im Folgenden wird der Einfachheit halber nur der Stokes – Fall weiterbehandelt. Die Summe in Gleichung (2) erstreckt sich über alle Eigenzustände des Moleküls.

Im Fall des normalen Raman – Effekts (Abb.2.1) tragen mehrere Molekülzustände $|r\rangle$ durch nichtverschwindende Übergangselemente des elektronischen Dipolmoments $\langle f|R_\rho|r\rangle\langle r|R_\sigma|i\rangle$ bei etwa gleichwertigen Nennern in (2) zur Streuintensität bei. Es ist daher nur bedingt gerechtfertigt von einem "virtuellen" Zwischenzustand zu sprechen. Der Begriff wurde von Herzfeld (1924) eingeführt und sollte das Prinzip der Energieerhaltung bei diesem Streuprozess verdeutlichen. Die damit suggerierte Trennung des Streuvorgangs in eine Absorption und eine darauf folgende Emission gilt strenggenommen nur im Resonanzfall mit einem nicht entarteten molekularen Eigenzustand. Nur dann wird die Summe (2) im wesentlichen durch einen einzigen elektronischen Summanden repräsentiert, der wegen $\hbar\omega_0 + E_i \approx E_r$ einen Resonanznenner trägt. Demgegenüber sind die Beiträge von anderen elektronischen Übergängen vernachlässigbar. Die Raman – Streuintensität nimmt in diesem Fall ein Maximum an.

2.1.2. Albrechts Näherungen

Zur Vereinfachung der Intensitätsformel (1) (2) für resonanznahe Anregung wurde von Albrecht (1961) (Tang und Albrecht 1970, Albrecht und Hutley 1971) ein Verfahren vorgeschlagen, das von der Gültigkeit der Born – Oppenheimer – Näherung ausgeht. Diese besagt, daß die Kerne eines vielatomigen Moleküls aufgrund des großen Massenunterschieds einer Änderung der Elektronenkonfiguration nur langsam folgen, während sich die Elektronen adiabatisch auf die Kernbewegungen einstellen. Damit lassen sich die Moleküleigenfunktionen in einen Kern – und einen Elektronenanteil faktorisieren.

Es wird nun der in Abb. 2.2 gezeichnete Fall betrachtet, daß Anfangszustand $|i\rangle$ und Endzustand $|f\rangle$ des Streuvorgangs im elektronischen Grund

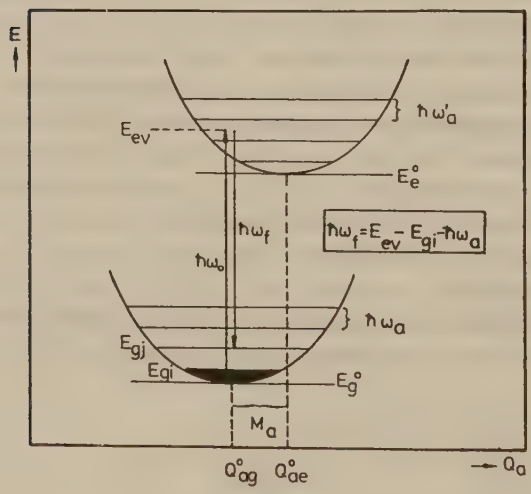


Abb. 2.2: Potentialverlauf der Normalschwingung ω_a eines Moleküls in harmonischer Näherung mit Energieübergängen bei Resonanz-Raman-Streuung; Bezeichnungen siehe Text.

zustand $|g)$ liegen und Resonanzanregung mit dem nächsthöheren elektronischen Zustand $|e)$ erfolgt. Mit der folgenden Notation für die Wellenfunktionen

$$
\begin{aligned}
|i\rangle &= \psi_i(q,Q) = \theta_g(q,Q)\phi_i^g(Q) \equiv |g)|i\rangle \\
|f\rangle &= \psi_f(q,Q) = \theta_g(q,Q)\phi_j^g(Q) \equiv |g)|j\rangle \qquad (3)\\
|r\rangle &= \psi_r(q,Q) = \theta_e(q,Q)\phi_v^e(Q) \equiv |e)|v\rangle
\end{aligned}
$$

und die Energieeigenwerte

$$
\begin{aligned}
E_i &= E_{gi} \\
E_r &= E_{ev} \qquad (4)\\
E_f &= E_{gj} = E_{ev}-E_{gi}-\hbar\omega_a
\end{aligned}
$$

läßt sich der Polarisierbarkeitstensor (2) dann schreiben

$$
(5)\quad (\alpha_{\rho\sigma})_{gi,gj} = \sum_{e,v} \left(\frac{\langle j|(g|R_\rho|e)|v\rangle\langle v|(e|R_\sigma|g)|i\rangle}{E_{ev}-E_{gi}-\hbar\omega_0-i\Gamma_e} + \frac{\langle j|(g|R_\sigma|e)|v\rangle\langle v|(e|R_\rho|g)|i\rangle}{E_{ev}-E_{gj}+\hbar\omega_0+i\Gamma_e} \right) .
$$

Die Integration über die elektronischen Koordinaten q kann nun ausgeführt werden. Damit hängt das Matrixelement des elektrischen Dipolmoments $(g|R_\rho|e)$ nur noch von den Kernkoordinaten Q ab. Die Linienbreite des angeregten elektronischen Zustands Γ_{ev} wird als nahezu konstant über dem Schwingungsunterraum $|v\rangle$ betrachtet $\Gamma_{ev} \to \Gamma_e$. Abb. 2.2 verdeutlicht die bei einem RR – Streuprozeß an einer Normalkoordinate Q_a auftretenden Energieübergänge. Das Potential der Molekülschwingung wird hier als harmonisch

angenommen, eine Näherung, die auch dem folgenden Kapitel zugrundeliegt. Wegen der veränderten Elektronenkonfiguration nehmen die Kerne im elektronisch angeregten Zustand eine andere Gleichgewichtslage ein. Die Größe der Verschiebung M_a ist für jede Schwingung Q_a des Moleküls charakteristisch.

Im nächsten Schritt wird vorausgesetzt, daß die elektronischen Wellenfunktionen nur schwach von Änderungen der Normalkoordinaten abhängen. Unter dieser Voraussetzung lassen sich $|e)$ und $|g)$ in eine Taylorreihe um die Kerngleichgewichtslagen Q_a^0 entwickeln (Herzberg und Teller 1933). Mit der Verschiebung ΔQ_a der a-ten Mode aus der Ruhelage gilt für die ersten Entwicklungsterme:

$$|e) = |e^0) + \sum_a \sum_{s \neq e} \frac{(h_a)^0_{es} \, \Delta Q_a}{E_e^0 - E_s^0} \, |s^0)$$

(6)

$$|g) = |g^0) + \sum_a \sum_{t \neq g} \frac{(h_a)^0_{gt} \, \Delta Q_a}{E_g^0 - E_t^0} \, |t^0)$$

Zu summieren ist über alle Normalkoordinaten a und über alle elektronischen Eigenfunktionen $|s), |t)$ mit Ausnahme von $|e)$ und $|g)$. $(h_a)^0_{es}$ stellt einen Kopplungsoperator dar, der die Wechselwirkung der elektronischen Zustände $|e)$ und $|s)$ über die Normalschwingung Q_a beschreibt. Damit lassen sich die Matrixelemente in (5) in einen rein elektronischen Teil und einen Schwingungsteil aufspalten. Gleichung (5) setzt sich dann im wesentlichen aus drei Anteilen zusammen, nämlich:

$$(7) \qquad (\alpha_{\rho\sigma})_{gi,gj} = A + B + C$$

mit

$$(8) \qquad A = \sum_{e \neq g} \sum_v \frac{(g^0|R_\rho|e^0)(e^0|R_\sigma|g^0)}{E_{ev} - E_{gi} - \hbar\omega_0 - i\Gamma_e} \langle j||v\rangle\langle v||i\rangle$$

$$B = \sum_{e \neq g} \sum_{v} \sum_{s \neq e} \sum_{a}$$

$$(9) \qquad \left(\frac{(g^0|R_\rho|e^0)(e^0|h_a|s^0)(s^0|R_\sigma|g^0)}{E_{ev}-E_{gi}-\hbar\omega_0-i\Gamma_e} \; \frac{\langle j||v\rangle\langle v|Q_a|i\rangle}{E_e^0 - E_s^0} + \right.$$

$$\left. + \frac{(g^0|R_\rho|s^0)(s^0|h_a|e^0)(e^0|R_\sigma|g^0)}{E_{ev}-E_{gi}-\hbar\omega_0-i\Gamma_e} \; \frac{\langle j|Q_a|v\rangle\langle v||i\rangle}{E_e^0 - E_s^0} \right)$$

C geht durch die Vertauschungen $s^0 \to t^0$, $E_e^0 - E_s^0 \to E_g^0 - E_t^0$, $t \neq g$ aus B hervor und kann wegen $|E_g^0 - E_t^0| \gg |E_e^0 - E_s^0|$ in den meisten Fällen unberücksichtigt bleiben. Der nichtresonante Term aus Gleichung (5) fehlt in (8) und (9), da im Weiteren nur RR – Streuung betrachtet wird.

Albrechts A – Term (8) beschreibt die Franck – Condon (FC) – Streuung, so benannt, da die Überlappintegrale $\langle j||v\rangle\langle v||i\rangle$ die Wurzeln von FC – Faktoren darstellen. Letztere treten explizit im Fall der Raman – Rayleigh – Streuung wegen $|i\rangle = |j\rangle$ in (8) auf. FC – Streuung findet nur in Resonanz mit einem einzigen angeregten elektronischen Zustand statt. Da die Matrixelemente in (8) nur dann von Null verschieden sind, wenn sie gegenüber allen Symmetrieoperationen der Punktgruppe des Moleküls invariant sind, können wegen des totalsymmetrischen Anfangszustands $|i\rangle$ nur totalsymmetrische Moden zur Streuintensität nach (8) beitragen. Der Wert der Überlappintegrale hängt dabei auch entscheidend von der Kernverschiebung M_a (siehe Abb. 2.2.) ab. Für großes M_a sind starke RR – Signale der entsprechenden Mode zu erwarten (vgl. auch (21)).

Der B – Term oder auch Herzberg – Teller – Term wird dann dominant gegenüber dem A – Term, wenn die Anregung in der Nähe zweier elektronischer Zustände $|e^0)$, $|s^0)$ erfolgt, welche über eine Molekülschwingung a gemäß $(e^0|h_a|s^0)$ gekoppelt sind. Wegen des Matrixelements $\langle j|Q_a|i\rangle$ können in

diesem Falle auch nichttotalsymmetrische Moden im RR – Spektrum beobachtet werden.

Die weitere Betrachtung der Streuintensitäten kann an dieser Stelle auf den A – Term eingeschränkt werden, da im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur FC – Streuung auftrat. Daß die von Albrecht vorgeschlagenen Näherungen auf realistischen Annahmen beruhen, wurde inzwischen durch den Vergleich von experimentell bestimmten Raman – Anregungsprofilen (REPs) mit den theoretischen Ergebnissen aus (8) und (9) an einer Reihe von Molekülen bestätigt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß resonanznahe Anregung in den S_1 – Zustand von Polyacetylen (Siebrand und Zgierski 1984) und von Carotinoiden (Tasumi et al.1973, Sufra et al.1977, Okamoto et al.1984) FC – Streuung an totalsymmetrischen Moden hervorruft, deren REPs mit der Frequenzabhängigkeit des A – Terms übereinstimmt. Bei RR – Streuung an Porphyrinen und Porphyrinderivaten hingegen (Nafie et al. 1973 ,Yu und Srivastava 1980) entscheidet die Wahl der Erregerwellenlänge ob A – Term oder B – Term Streuung dominiert. Während bei Anregung in den S_2 – Zustand (Soret – Bande) ebenfalls nur totalsymmetrische Raman – Linien beobachtet werden, treten bei Einstrahlung im Bereich des S_1 – Übergangs (α – Bande) auch nichttotalsymmetrische Moden auf, deren Intensitätsabhängigkeit durch (9) beschrieben wird.

2.1.3. Der Depolarisationsgrad

Die Symmetrieeigenschaften eines Moleküls äußern sich auch in der Form seines Polarisierbarkeitstensors. In Flüssigkeiten und amorphen Festkörpern lassen sich die gemessenen Raman – Streuintensitäten wegen der Beiträge aller Orientierungen nicht auf einzelne Tensorelemente zurückführen. Es ist jedoch möglich, die Normalschwingungen eines Moleküls bezüglich dreier Invarianten des Polarisierbarkeitstensors zu klassifizieren (Brandmüller und Moser 1962, Suschtschinskij 1974). Dies sind der isotrope g_0, der anisotrop symmetrische g_s und der anisotrop antisymmetrische Teil g_a des Tensors:

$$g_0 = \frac{1}{3}\,(\alpha_{xx}+\alpha_{yy}+\alpha_{zz})^2$$

(10) $$g_s = \frac{1}{3}\,((\alpha_{xx}-\alpha_{yy})^2 + (\alpha_{xx}-\alpha_{zz})^2 + (\alpha_{yy}-\alpha_{zz})^2) + \frac{1}{2}\,((\alpha_{xy}+\alpha_{yx})^2 + (\alpha_{xz}+\alpha_{zx})^2 + (\alpha_{yz}+\alpha_{zy})^2)$$

$$g_a = \frac{1}{2}\,((\alpha_{xy}-\alpha_{yx})^2 + (\alpha_{xz}-\alpha_{zx})^2 + (\alpha_{yz}-\alpha_{zy})^2)$$

Damit kann die in den gesamten Raumwinkel 4π abgestrahlte Intensität aus (1) auch geschrieben werden:

(11) $$I_f = \frac{8\pi}{9c^4}\, I_0\, \omega_f^4\, (g_0+g_a+g_s)$$

In einem realen Raman - Experiment wird stets nur das in einen Raumwinkel $d\Omega$ um eine gewählte Beobachtungsrichtung gestreute Licht registriert. Abb. 2.3 zeigt zum Beispiel eine 90 $^{\circ}$ - Anordnung mit den bezüglich der Streuebene

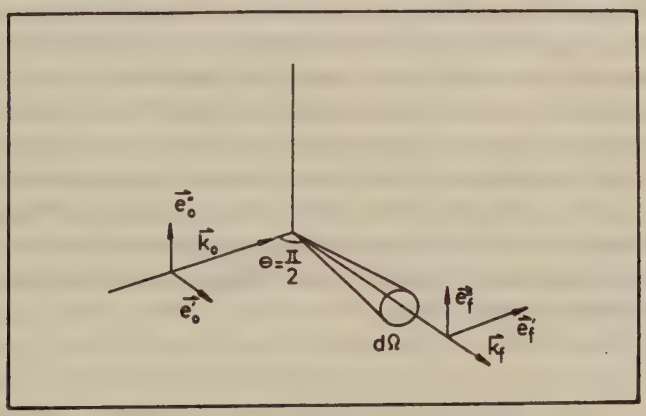


Abb. 2.3.: 90°-Raman-Streuanordnung zur Definition des Depolarisationsgrades

ausgezeicheneten linearen Polarisationen des einfallenden Lichts, $\vec{e}_0$ und des Streulichts $\vec{e}_f$. Für die in $d\Omega$ gestreute Intensität (Abb. 2.3) mit parallelen Polarisationen des Erregerlichts ($\vec{e}_0$) und des beobachteten Streulichts ($\vec{e}_f$) nimmt (11) nach Mittelung über alle Molekülorientierungen die Form an (Sonnich Mortensen, 1980)

$$(12) \qquad I_{\parallel} = I_0 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\parallel} = I_0 \left(\frac{\omega_f}{c}\right)^4 \frac{1}{30} \left(10g_0+4g_s\right) .$$

Und nach Drehung einer der beiden Polarisationsrichtungen um 90^0

$$(13) \qquad I_{\perp} = I_0 \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\perp} = I_0 \left(\frac{\omega_f}{c}\right)^4 \frac{1}{30} \left(3g_s+5g_a\right) .$$

$(d\sigma/d\Omega)$ wird als differentieller Raman – Streuquerschnitt bezeichnet und hat die Dimension einer Fläche. Damit läßt sich der Depolarisationsgrad ρ schreiben

$$(14) \qquad \rho = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{(3g_s+5g_a)}{(10g_0+4g_s)} .$$

Im Fall gewöhnlicher Raman – Streuung ist der Polarisierbarkeitstensor symmetrisch $\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$ und $g_a = 0$. Da für nichttotalsymmetriche Moden die Spur g_0 verschwindet ist $\rho = 3/4$. Diese lassen sich also durch Depolarisationsgradmessungen von totalsymmetrischen Moden im Raman – Spektrum unterscheiden für die gilt: $0 \leq \rho < 3/4$. Placzek (1934) hat bereits darauf hingewiesen, daß unter Resonanzbedingungen der Tensor auch antisymmetrisch, also $\rho > 3/4$ wegen $g_a \neq 0$ werden kann. Dies wurde erstmals von Spiro und Strekas (1972) an Hämproteinen für Resonanz gemäß dem Herzberg – Teller – Term (9) beobachtet und später auch an anderen Molekülen eingehend untersucht (Collins et al. 1973, Verma und Bernstein 1974).

2.1.4. Raman – Anregungsprofile und das Absorptionsspektrum

Gewöhnliche Raman – Streuung erlaubt Rückschlüsse auf die Bindungskräfte eines Moleküls im Grundzustand. Darüber hinaus enthalten die Linienintensitäten im Resonanzfall Informationen über den elektronisch angeregten Zustand. Dies äußert sich in der Abhängigkeit der Raman-Intensitäten von der Erregerwellenlänge, den sog. Raman – Anregungsprofilen (REPs). Versuche, einen Zusammenhang zwischen den REPs und dem Absorptionsspektrum theoretisch abzuleiten, wurden schon früh von Suschtschinskij und Zubov (1962) und Sonnich Mortensen (1971) unternommen. In jüngster Zeit wurden zwei unterschiedliche Wege erfolgreich eingeschlagen, einmal ein von Tonks und Page (1979 a,b) beschriebenes Verfahren, das auf Hizhnyakov und Tehvers (1967) Korrelationsformalismus basiert und zum anderen die Berechnung der Überlappintegrale in (8) und (9) aus Modellen für den FC – Raum. Während die erste Methode ohne ein explizites Modell über den elektronischen Zustand auskommt, und daher die Raman – Anregungsprofile exakt auf der Basis der sog. Standardannahmen (harmonischer Oszillator, lineare Verschiebung der Schwingungspotentiale beim Übergang in den elektronisch angeregten Zustand) beschreibt, bietet letztere die Möglichkeit, im Vergleich zwischen Theorie und Experiment explizite Modellparameter als Fitgrößen zu bestimmen. Beispiele hierfür erbrachten Inagaki et al. (1974) und Sufra et al. (1977) durch Berechnungen für β – Carotin, und Champion und Albrecht (1979,1980) durch ihre Arbeiten an Cytochrom c. Während sich das Absorptionsspektrum von β – Carotin im Wesentlichen mit den Beiträgen dreier Molekülschwingungen darstellen läßt, können die Verhältnisse bei Cytochrom c eher durch die Annahme einer asymmetrischen Dichteverteilung im FC – Raum wiedergegeben werden. Champion und Albrecht (1981) zeigten, daß dieses Ergebnis genau mit dem Resultat aus der Transformationstheorie übereinstimmt, wenn dieselben Standardnäherungen nachträglich eingeführt werden. Umgekehrt wiesen Dellepiane et al. (1982) nach, daß der allgemeine Ausdruck für die Resonanz – Raman – Streuintensitäten aus der Transformationstheorie in Albrechts A – Term übergeht, wenn dieselben Näherungen gemacht werden. Hassing und Sonnich Mortensen (1980) gelang es, die von Tonks und Page benutzten Beziehungen aus den Kramers – Kronig-Relationen und einer Rekursivformel für FC – Produkte in harmonischer Näherung abzuleiten. Die dabei zugrundegelegten Voraussetzungen treffen für die in

der vorliegenden Arbeit untersuchten Photosynthesepigmente zu. Daher wird das Verfahren hier kurz beschrieben.

Ausgangspunkt ist Albrechts A – Term (8), d. h. die Ableitung gilt für totalsymmetrische Moden $\rho < 3/4$ bei strenger Resonanz mit nur einem elektronisch angeregten Zustand $|e)$. Das Molekül befinde sich im Grundzustand mit $|i\rangle = 0$ und $E_{gi} \equiv 0$ bei $T = 0$ K. Mit den Abkürzungen

$$\rho^0_{ge} \; \sigma^0_{eg} \; := \; (g^0|R_\rho|e^0)(e^0|R_\sigma|g^0)$$

$$A_{0,j}(\omega_0) \; := \; \sum_v \frac{\langle j||v\rangle\langle v||0\rangle}{E_{ev}-E_{gi}-\hbar\omega_0-i\Gamma_e}$$

läßt sich (8) schreiben

$$(15) \qquad (\alpha_{\rho\sigma})_{g0,gj} \; = \; \rho^0_{ge}\,\sigma^0_{eg} \; A_{0,j}(\omega_0) \; .$$

Nach dem optischen Theorem (Jackson 1975) gilt für den totalen Absorptionsquerschnitt σ_a eines Moleküls

$$(16) \qquad \sigma_a(\omega_0) \; = \; 4\pi \, \frac{\omega_0}{c} \sum_{\rho=x,y,z} \mathrm{Im}\; \alpha_{\rho\rho}(\omega_0) \; .$$

Nach Mittelung über alle Orientierungen der Moleküle lautet der totale Absorptionsquerschnitt einer Flüssigkeit oder eines Gases mit obiger Notation

$$(17) \qquad \sigma_a(\omega_0) \; = \; \frac{4\pi}{3} \, \frac{\omega_0}{c} \, |\vec{r}^{\,0}_{eg}|^2 \; \mathrm{Im}\; A_{0,0}(\omega_0) \; ,$$

wobei $|\vec{r}^{\,0}_{eg}|^2 := |(e^0|\vec{R}|g^0)|^2$. Aus (12) und (13) folgt für die differentiellen Raman – Streuquerschnitte mit $g_a = 0$

$$(18) \qquad \Phi(\omega_0) = \left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\parallel} - \frac{4}{3}\left(\frac{d\sigma}{d\Omega}\right)_{\perp} = \left(\frac{\omega_L}{c}\right)^4 \frac{1}{3}\, g_0 \,.$$

Gleichung (18) läßt sich mit (15) umformen. Für Raman – Grundtöne ($j = 1$) erhält man:

$$(19) \qquad \Phi(\omega_0) = \frac{1}{9}\left(\frac{\omega_L}{c}\right)^4 |\vec{r}^{\,0}_{eg}|^4 \; |A_{0,1}(\omega_0)|^2$$

Unter der Annahme, das Schwingungspotential sei harmonisch und im elektronisch angeregten Zustand einfach um M_a verschoben (vgl. Abb. 2.2), lassen sich Produkte von FC – Faktoren wie in $A_{0,1}(\omega_0)$ aufgrund einer Rekursivformel umrechnen (Hassing und Sonnich Mortensen 1980), und es gilt:

$$(20) \qquad A_{0,1}(\omega_0) = M_a \left(A_{0,0}(\omega_0) - A_{0,0}(\omega_0 - \omega_a)\right)$$

Damit läßt sich der differentielle Raman – Streuquerschnitt aus (18) schreiben

$$(21) \qquad \Phi(\omega_0) = \frac{1}{9}\left(\frac{\omega_0 - \omega_a}{c}\right)^4 |\vec{r}^{\,0}_{eg}|^4 \, M_a^2 \; |A_{0,0}(\omega_0) - A_{0,0}(\omega_0 - \omega_a)|^2 \,.$$

Die bereits erwähnte Abhängigkeit der RR – Streuintensität von der Kerngleichgewichtsverschiebung M_a wird hier ersichtlich. Der Raman – Ausdruck $A_{0,1}(\omega_0)$ wurde durch die harmonische Näherung in die Differenz zweier Rayleigh – Terme mit den Frequenzen ω_0 und $\omega_0 - \omega_a$ zerlegt. Die Funktion $A_{0,0}(\omega_0)$ läßt sich jedoch aus dem totalen Absorptionsquerschnitt σ_a berechnen, da ihr Realteil und ihr Imaginärteil durch eine Kramers – Kronig – Relation (Jackson 1975, Champion und Albrecht 1981, Hassing und Sonnich Mortensen 1980) verknüpft sind. Es gilt mit (17)

$$(22) \quad A_{0,0}(\omega_0) = C \left\{ P\int_0^\infty \frac{\sigma_a(\omega)}{\omega^2-\omega_0^2}\, d\omega + i\frac{\pi}{2\omega_0}\sigma_a(\omega_0) \right\} ,$$

$$\text{mit} \quad C = \frac{6c}{4\pi^2 |\vec{r}^{\,0}_{eg}|^2} \quad .$$

wobei P für den Hauptwert des Integrals steht. Damit lassen sich aus einem gemessenen Absorptionspektrum die REPs für verschiedene Raman – Linien berechnen. Die Gleichungen (21) und (22) entsprechen genau den von Tonks und Page (1979) aus der allgemeinen Transformation abgeleiteten Beziehungen.

2.2. Die Photosynthese

2.2.1. Bruttoreaktion und das Zwei – Stufen – Modell

Die Photosynthese (PS) ist einer der interessantesten und effektivsten Umwandlungs – und Speicherprozesse von Sonnenenergie auf der Erde. Sie umfaßt eine komplizierte Abfolge von Redoxreaktionen mit dem Ergebnis einer Oxidation von Wasser zu O_2 und einer Reduktion von CO_2 zu Kohlenwasserstoff. Dabei müssen pro Molekül O_2 vier Elektronen gegen ein Potential von 1,4 V transportiert werden. Mit den beteiligten Redoxpaaren

$$(23) \quad \begin{aligned} &2\,H_2O \rightarrow 4\,e^- + 4\,H^+ + O_2 \\ &4\,e^- + 4\,H^+ + CO_2 \rightarrow CH_2O + H_2O \end{aligned}$$

läßt sich eine Bruttoreaktionsgleichung (Emerson und Lewis 1942) aufstellen

$$(24) \quad 12\,H_2O + 6\,CO_2 \rightarrow 6\,O_2 + C_6H_{12}O_6 + 6\,H_2O.$$

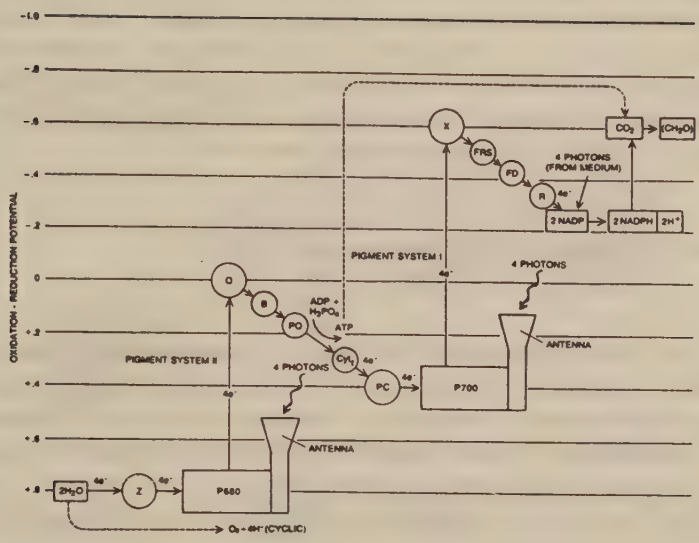


Abb. 2.4.: Zwei-Stufen-Modell der Photosynthese nach Govindjee und Govindjee (1974)

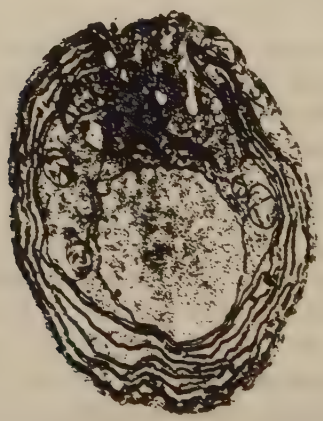
Nach Ablauf dieser Reaktion liegt ein Teil der Lichtenergie in Form von Hexosen gespeichert vor.

Einen tieferen Einblick in die Komplexität der PS – Reaktion in Pflanzen und Algen vermittelt das Zwei – Stufen – Modell (Abb. 2.4). Zwei membrangebundene Proteinpigmentkomplexe, die sogenannten Reaktionszentren P 680 und P 700, agieren als lichtgetriebene Elektronenpumpen. Sie übertragen pro freigesetztes Molekül O_2 vier Elektronen (e^-) von Wasser bzw. dem primären Donor Z in zwei Stufen auf 2 NADP Moleküle, welche anschließend vier Protonen aus der Umgebung aufnehmen und damit zu starken Reduktoren 2 NADPH + $2H^+$ werden. Anschließend wird im sog. Calvinzyklus (Rabinowitch und Govindjee 1969) CO_2 unter Mitwirkung des Reduktionsmittels NADPH und des nach der ersten Lichtreaktion gebildeten molekularen Energiespenders ATP zu Kohlehydrat reduziert. Energielieferanten für die Photo-

synthesereaktion sind Lichtquanten (8 pro O_2 - Molekül), welche in der sog. Primärreaktion von den Pigmenten der Antennenkomplexe absorbiert werden. Die dabei aufgenommene Anregungsenergie wird durch Singulett - Singulett Energietransfer zwischen benachbarten Antennenpigmenten auf die Reaktionszentren übertragen (Mathis und Paillotin 1981).

2.2.2. Der Aufbau der Chloroplasten

Die Photosynthesereaktion der Pflanzen - und Algenzellen läuft in der inneren Membran der Chloroplasten ab. Letztere sind Zellorganellen, welche je nach Spezies in verschiedenen Formen vorkommen. So enthalten höhere Pflanzen linsenförmige, *Grünalgen* hingegen becherförmig eingestülpte Chloroplasten wie in der elektronenmikroskopischen Aufnahme der Grünalge *Chlorella* (Abb. 2.5) zu sehen. Die Zellflüssigkeit im Inneren der Chloroplasten wird als



Electron micrograph of Chlorella showing the cup-shaped chloroplast, magnification 24,000×. (Courtesy of T. Bisalputra, University of British Columbia, Canada.)

Abb. 2.5.: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Chlorella, aus Rabinowitch (1969)

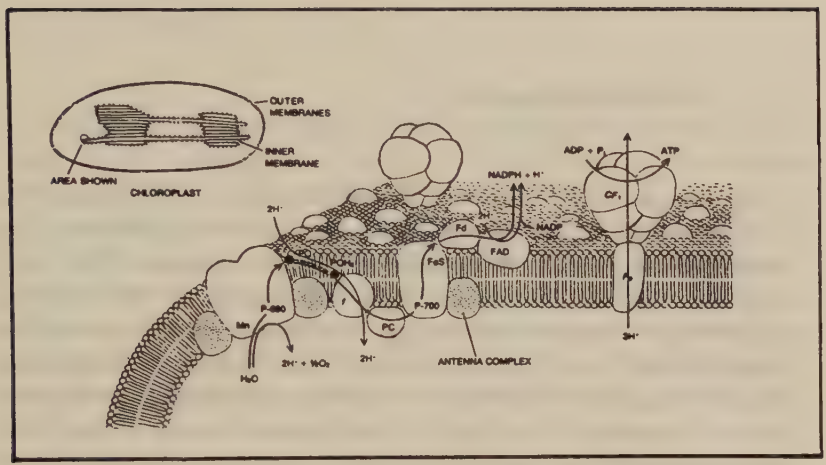


Abb. 2.6.: Modell der Chloroplastenmembran, H^+-Ionentransport und ATP-Produktion im Verlauf der PS-Reaktion, nach Hinkle und Mc Carty (1978)

Stroma bezeichnet. Darin eingebettet liegt die Photosynthesemembran, auch Thylakoid genannt. In Abb. 2.6 wird die räumliche Anordnung der verschiedenen an der PS beteiligten Pigmentproteinkomplexe im Thylakoiden veranschaulicht. Entscheidend ist ein mit dem Elektronentransport verbundener H^+ – Ionentransport durch die Membran. Dabei entsteht ein H^+ – Ionengradient, der dem ATP – synthetisierten Enzym als Energiequelle (Junge 1977) dient. Entsprechend ihrer Funktion müssen die Antennenkomplexe in unmittelbarer Nähe der Reaktionszentren lokalisiert sein. Mit ihren Farbstoffen, den sog. Antennenpigmenten, bestimmen sie die Lichtabsorptionseigenschaften des Chloroplasten und damit der ganzen Zelle. Sie sind die primären Beobachtungsobjekte von *in vivo* RR – Streuexperimenten.

2.2.3. Die Antennenpigmente

Die Pigmente der Antennenkomplexe gliedern sich in zwei Molekülgruppen, die Chlorophylle und die Carotinoide. Im sogenannten Primärprozess der Photosynthese absorbieren sie das sichtbare Licht und übertragen ihre Anregungsenergie auf die Chl a Moleküle der Reaktionszentren. Darüberhinaus erfüllen einige Carotinoide eine wichtige Schutzfunktion gegen zu intensive Lichteinwirkung. Sie sind in der Lage durch Wechselwirkung mit freigesetztem Singulett – Sauerstoff eine Schädigung der Zelle durch lichtinduzierte Oxidationen zu verhindern (Krinski 1979). Im Folgenden werden die häufigsten Antennenpigmente näher besprochen und deren, hinsichtlich einer Anwendung der RR – Spektroskopie wichtige, Absorptionsspektren diskutiert.

Algal group	Chlorophyll			
	Chl *a*	Chl *b*	Chl *c* ($c_2 \pm c_1$)	Chl *d*
Cyanophyceae	+	—	—	—
Rhodophyceae	+	—	—	+
Cryptophyceae	+	—	+	—
Dinophyceae	+	—	+	—
Rhaphidophyceae	+	—	+	—
Chrysophyceae	+	—	+	—
Haptophyceae	+	—	+	—
Bacillariophyceae	+	—	+	—
Xanthophyceae[1]	+	—	+	—
Phaeophyceae	+	—	+	—
Prasinophyceae	+	+	—	—
Euglenophyceae	+	+	—	—
Chlorophyceae[2]	+	+	—	—

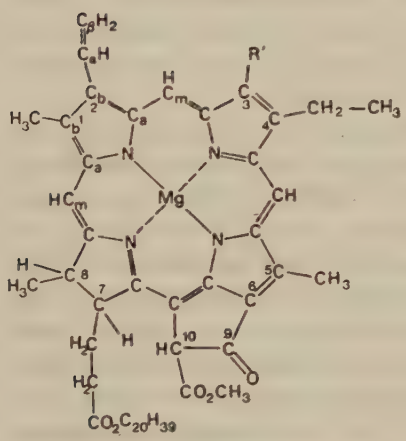
[1] includes Eustigmatophyceae, [2] includes Charophyceae.
+ means the chlorophyll is present in at least some members; — means the chlorophyll has not been recorded in any member.

Tab. 2.1.: Verteilung der Chlorophylle auf die verschiedenen Algenklassen, nach Meeks (1974)

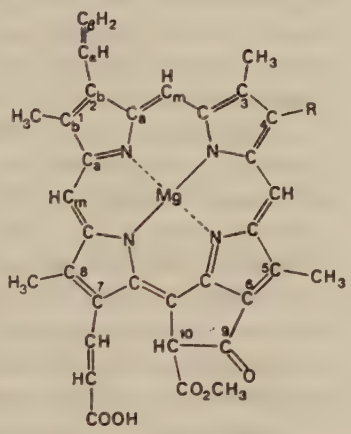
2.2.3.1 Chlorophylle

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Verteilung der wichtigsten Chlorophylle auf die verschiedenen Algenklassen. Die *Grünalgen (Chlorophyceae)* gelten dabei als repräsentativ für die grünen Landpflanzen.

Grundsätzlich lassen sich eine "grüne Entwicklungslinie" der PS – Zellen, die durch Chl a und das Hilfspigment Chl b charakterisiert ist, und eine "braune Entwicklungslinie" unterscheiden. Letztere ist anstelle von Chl b an Chl c als Hilfspigment gebunden und zeigt sich in *marinen Algen* und *Kieselalgen*. Die Strukturformeln (Abb. 2.7) offenbaren einen wesentlichen Unterschied zwischen Chl a und Chl b einerseits und Chl c andererseits. Erstere gehören wegen der



a) Chlorophyll a : R' = CH_3
Chlorophyll b : R' = C=O



b) Chlorophyll c_1: R = CH_2—CH_3
Chlorophyll c_2: R = CH=CH_2

Abb. 2.7.: Strukturformeln der wichtigsten Chlorophylle in Algen und höheren Pflanzen

Einfachbindung zwischen Pos. 7 und Pos. 8 zu den Chlorinen. Sie tragen an Pos. 7 eine Fettsäurekette und unterscheiden sich lediglich durch eine Carbonylgruppe an Pos. 3. Chl c tritt in der Natur stets als Mischung zweier Komponenten c_1 und c_2 (Jeffrey 1969) auf. Sie gehören wegen der Doppelbindung zwischen 7 und 8 zu den Porphyrinen . Die Bezeichnung Chlorophyll c für beide Moleküle hat eher historische Gründe. Sie ist auch heute noch in der Literatur gebräuchlich. Wegen ihres geringfügigen Unterschieds – eine Vinylgruppe an Pos. 4 anstelle eines Äthylrests (Abb. 2.7) – war das aus Zellen der *Kiesel* – und *Braunalgen* isolierte Chl c lange Zeit nicht als Mischung erkannt worden. Erst 1966 gelang es Dougherty et al. die Anteile chromatographisch aufzutrennen und als Magnesium tetradehydrophaeoporphyrin a_5 – (c_1) und hexadehydrophaeoporphyrin a_5 – monomethylester (c_2) zu identifizieren. Allen Chlorophyllen gemein ist das Mg – Zentralatom. Aufgrund eines ringförmigen π – Elektronensystems, das sich über mehr als 22 Bindungen erstreckt, besitzen die Chlorophylle Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich. Damit lassen sich RR – Spektren durch die intensive blaugrüne Strahlung eines Ar^+ – Lasers kontinuierlich erregen. Die Absorptionsspektren der wichtigsten Algenchlorophylle *in vitro* sind in Abb. 2.8 zu sehen.

Charakteristisch für die Absorptionsspektren von Porphyrinen und deren Derivaten ist das Auftreten einer Liniengruppe im sichtbaren Spektralbereich (Q – Bande) und einer im nahen UV (B – oder Soret – Bande). Die Absorptionsbanden entsprechen $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergängen zwischen einem bindenden und einem antibindenen Molekülorbital (Platt 1953). Nach Gouterman (1959, 1961, et al. 1963) lassen sich die Absorptionsspektren der Porphyrine in einem 4 – Orbital – Modell beschreiben. MO – Rechnungen ergaben für das energiereichste vollbesetzte und das darunterliegende vollbesetzte Grundzustandsorbital a_{1u} – bzw. a_{2u} – Symmetrie (Longuet – Higgins 1950).

Wegen einer D_{4h} – Symmetrie ($\frac{4}{m}\frac{2}{m}\frac{2}{m}$ int. Schreibweise) muß das nächsthöhere unbesetzte Orbital bezüglich zweier in der Molekülebene liegender Achsen entartet (e_{gx}, e_{gy}) sein. Der höherenergetischen B – Bande oder Soret – Bande entspricht der $a_{2u} \rightarrow e_g$ und der Q – Bande der $a_{1u} \rightarrow e_g$ Übergang. Die Übergangsdipolmomente selbst liegen in der Porphinebene und sind entartet mit E_u – Symmetrie (Sponer und Teller 1941). Es kommt daher zu einer starken Kopplung mit ebenen Gerüstschwingungen. Letztere erfahren dadurch eine große Resonanzverstärkung im Raman – Effekt. Die Kopplung führt außerdem

Abb. 2.8.: Absorptionsspektren von Chlorophyllen

— Chl a in Äthanol, 140 K
--- Chl b in Äthanol, 140 K
..... Chl c in Aceton , 298 K
(Chl c_1 : Chl c_2 = 2 : 1)

zum Auftreten einer starken Schwingungsnebenbande Q (0 – 1) im Absorptionsspektrum der Porphyrine.

Im Einzelfall hängen sowohl die Höhe als auch die Lage der charakteristischen Absorptionsbanden eines bestimmten Porphyrinderivats von der tatsächlichen Symmetrie des ringförmigen π – Elektronensystems ab. Ist die Verwandschaft mit der D_{4h} – Symmetrie enger, wie zum Beispiel bei Chl c (Abb. 2.8), so tritt jeweils eine UV – Bande und eine Q – Bande mit Schwingungsnebenbanden auf. Wegen der destruktiven Überlagerung der nahezu entarteten Dipolmomente ist dann die Intensität der Q – Bande klein im Vergleich zur B – Bande, bei der sich die Übergangselemente addieren (Gouterman 1961). Dieser Um-

stand macht die *in vivo* Beobachtung von Chl c fast unmöglich. Anders verhält es sich mit Chl a und Chl b (Abb. 2.8). Wegen der fehlenden Doppelbindung zwischen Pos. 7 und 8 des Makrorings (Abb. 2.7), wird die Entartung des e_g - Orbitals aufgehoben und es werden vier $\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge sichtbar, nämlich Q_x, Q_y, B_x, B_y. Damit werden auch die im strengen D_{4h} - Modell verbotenen Q - Übergänge erlaubt, was zur Folge hat, daß Q - Banden und B - Banden ähnliche Intensitäten aufweisen (vgl. Abb. 2.8).

2.2.3.2. Carotinoide

Die Antennenkomplexe photosynthetisierender Zellen enthalten eine Reihe verschiedener Carotinoide. Gemeinsames Merkmal dieser Molekülgruppe ist eine lineare Kette konjungierter C - C Doppelbindungen. An den Kettenenden befinden sich sog. Iononenringe, welche je nach Carotinoid verschiedene Substituenten aufweisen. Handelt es sich dabei um reine Kohlenwasserstoffe, so spricht man von Carotinen, treten OH - Gruppen auf von Carotenolen. Eines der wichtigsten Carotinoide ist das β - Carotin (Abb. 2.9). Es kommt nahezu in allen PS - Zellen in hohen Konzentrationen vor (Goodwin 1971). Sein Absorptionsverhalten im sichtbaren Spektralbereich wird vom niedrigsten Singulett-Singulett Übergang $\pi \rightarrow \pi^*$ bestimmt. Das Molekül liegt in einer Ebene und zeigt annähernd D_{2h} - Symmetrie ($\frac{2}{m}\frac{2}{m}\frac{2}{m}$ int. Schreibweise). Der Übergang vom Grundzustand (a_{1g}) in den angeregten Zustand (b_{1u}) erfolgt längs der

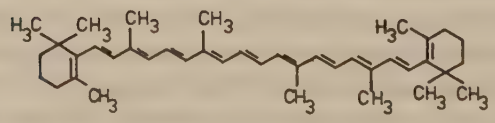


Abb. 2.9.: Strukturformel von ß - Carotin

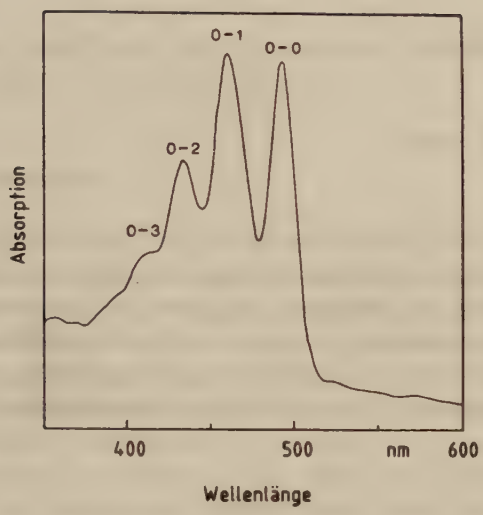


Abb. 2.10.: Absorptionsspektrum von ß-Carotin in Isopentan, 125 K

Molekülachse. Interne Konversion sorgt dafür, daß der b_{1u} - Zustand schnell entvölkert wird. Dadurch tritt keine Fluoreszenz auf, ein Umstand, der die Aufnahme von RR - Spektren ermöglicht. Bei tiefen Temperaturen lassen sich im Absorptionsspektrum Schwingungsnebenbanden bis zur dritten Ordnung (Abb. 2.10) auflösen.

3. Probenpräparation

3.1. Pigmente *in vitro*

Chl a, Chl b und β - Carotin wurden bei Fa. Sigma gekauft. Freundlicherweise stellte Prof. Scheer vom botanischen Institut der Universität München eine Chl c Probe zur Verfügung. Sie enthielt die Komponenten Chl c_1 und Chl c_2 etwa im Verhältnis $c_1 : c_2 = 2 : 1$. Für RR - Messungen wurden die lichtsensiblen Pigmente in Aceton gelöst und im Dunkeln in die Tieftemperaturküvette eingesetzt. Die Abkühlung im Kryostaten erfolgte dann möglichst rasch.

3.2. Algenzucht

Für die *in vivo* Untersuchungen wurde eigens eine Algenzuchtanlage aufgebaut. Diese bestand aus einem thermostatisierten Wasserbad ($T = 31^0C$) in das spezielle Zuchtröhren eintauchten. Letztere enthielten die jeweilige Nährlösung (Schlösser, 1982) für die Aufzucht von einzelligen *Grünalgen* (*Chlorella fusca*) oder *Kieselalgen* (*Phaeodactylum tricornutum*, *Gomphonema parvulum*). Die Zuchtröhren wurden im 12 h hell 12 h dunkel Rhythmus durch Leuchtstofflampen (L 15 W/25 Universalweiß) beleuchtet und kontinuierlich begast. Die Durchflußmenge des CO_2/Luftgemisches (5 % CO_2) betrug 800 cm^3/min. Für regelmäßige Vitalitätskontrollen stand ein Leitz Mikroskop, (Vergrößerung bis 1000 fach) zur Verfügung.

Die im Laufe der vorliegenden Arbeit gezüchteten Algen entstammten der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen. Während die Aufzucht der *Grünalgen* über Monate hinweg keine Probleme bereitet, mußten die Kulturen der *Diatomeen* nach einigen Wochen jeweils neu angesetzt werden. Hier erwieß sich die Zucht auf Agar als erfolgreicher. Für RR - Messungen konnten solche Zellkolonien zusammen mit dem Nährboden in die Meßküvette eingesetzt werden.

Flüssigkeitskulturen wurden entweder direkt in einer Durchflußküvette spektro-

skopiert, oder abzentrifugiert und nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser als Zellpaste in den Kryostaten eingesetzt.

3.3. Einfriervorgang

Für RR - Messungen bei tiefen Temperaturen stand ein Verdampferkryostat (Leybold VOK 4 - 300) zur Verfügung, der wahlweise mit flüssigem N_2 oder flüssigem He betrieben werden konnte. Zur Vorbereitung von *in vivo* Experimenten wurden die abzentrifugierten Zellen zunächst mit einem Tropfen destilliertem Wasser aufgeschüttelt. Dabei entstand eine sehr dichte Zellsuspension, die dann vorsichtig auf Filterpapier aufgeträufelt wurde. Durch den Wasserentzug bildete sich eine Zellpaste, die möglichst rasch in die Raman - Küvette eingebracht und im Kryostaten abgekühlt wurde. Eine typische Abkühlkurve, aufgenommen mit *Chlorella* - Zellen, ist in Abb. 3.1 zu sehen.

Die Temperatur wurde mit Hilfe eines Eisen - Constantan Thermoelements ermittelt, dessen Thermospannung kontinuierlich von einem Schreiber aufgezeichnet wurde. Der Meßkopf befand sich dabei unmittelbar in der Zellpaste. Während des Abkühlvorgangs blieb die Kühlleistung des Kryostaten konstant. Wie Abb. 3.1 zeigt, kommt es zu einer starken Unterkühlung der wasserhaltigen Algen am Gefrierpunkt. Die schnelle Abkühlung nach Abgabe der Erstarrungswärme auf die Temperatur der Kupferküvette kann Schädigungen in den Zellen hervorrufen (Scheiwe et al. 1978). Es wurden daher ein Einfrierverfahren mit geregelter Kühlleistung vorgeschlagen (Scheiwe und Schwindke 1978), um einen steilen Temperatursturz nach dem Phasenwechsel möglichst zu vermeiden. Damit konnten Überlebensraten von 90 % mit Lymphozyten erreicht werden. Im vorliegenden Fall genügte es, die Kühlleistung von Hand nachzuregeln, da Algenzellen wegen ihrer starken Zellwand wesentlich größeren Belastungen ausgesetzt werden können als z.B. Lymphozyten. Die unverminderte Vitalität der Zellen nach einem Abkühl - und Auftauzyklus zeigte sich in der Tatsache, daß sie das Wachstum wiederaufnahmen, nachdem sie erneut in Nährlösung gebracht wurden. Es konnten nur vereinzelt zerstörte Zellen unter dem Mikroskop beobachtet werden.

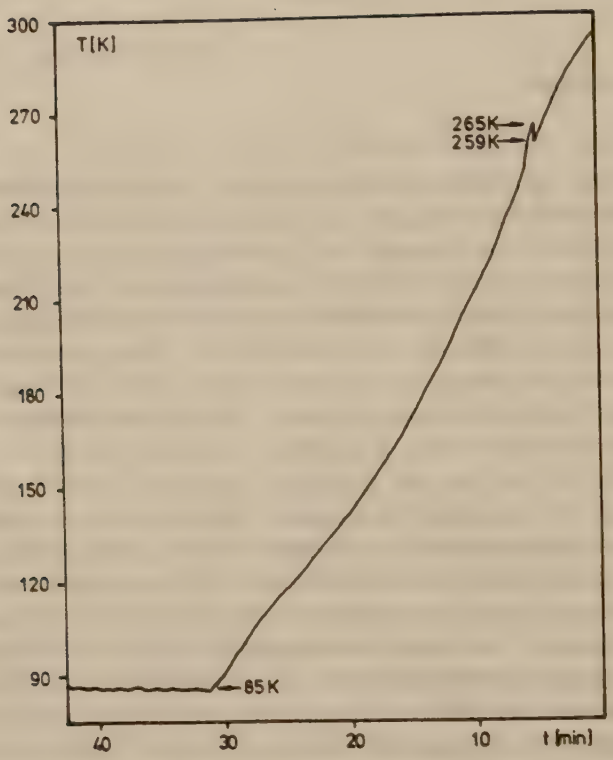


Abb. 3.1.: Zeitlicher Temperaturverlauf einer Algenzellpaste während des Einfriervorgangs im Kryostaten bei konstanter Kühlleistung

4. Experimentelle Methoden

4.1. Absorptionsmessungen

Die Absorptionsspektren der vorliegenden Arbeit wurden an einem Philips Pye Unicam Spektrophotometer PU 8800 registriert. Durch den Einsatz eines Oxford N_2 - Badkryostaten konnten auch Messungen bei tiefen Temperaturen ausgeführt werden (Schlele 1985).

4.2. Die Raman - Apparatur

Abb 4.1. stellt den Aufbau eines 90 ^{0} - Raman - Streuexperiments schematisch dar. Als Erregerlichtquellen standen ein Ar^+ - Laser und ein

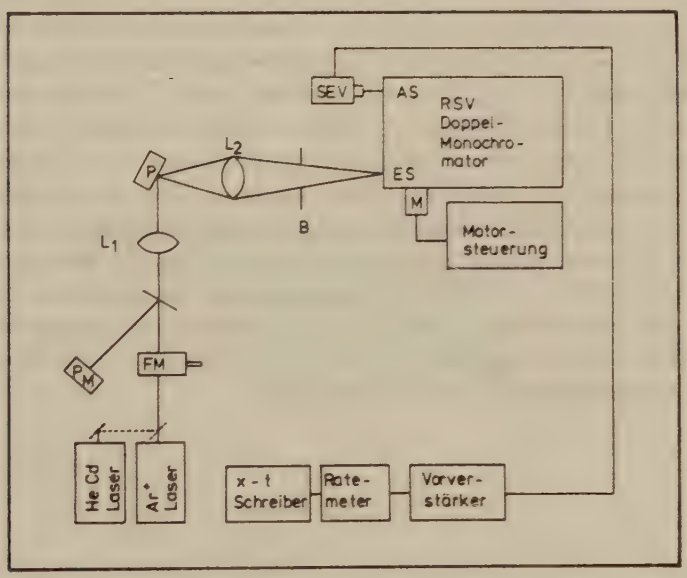


Abb. 4.1.: Schematische Darstellung der Raman-Streuapparatur

He – Cd Laser zur Verfügung. Im Verlauf der experimentellen Arbeit konnte ein Prismenmonochromator (FM) der Fa. Anaspec beschafft werden, um störende Plasmalinien zu unterdrücken. Ein Teil des Erregerlichts wurde durch einen Strahlteiler ausgeblendet und einem Powermeter zugeführt, dessen Ausgang mit dem Schreiber verbunden war. Die Linse L_1 (Abb. 4.1) fokusiert den Erregerstrahl in die Probe P, und die zweite Linse L_2 bildet das Streuzentrum auf den Eintrittsspalt (ES) des RSV – Doppelmonochromators ab.

Der Spektrograph hat eine Brennweite f von 1.07 m. Er ist mit holographischen Gittern (1200 g/mm) ausgerüstet. Bei Spaltbreiten von 10 µm erreicht er eine maximale Auflösung von 0,5 cm^{-1} bei 17268 cm^{-1} in erster Ordnung. Die den Austrittsspalt (AS) des Monochromators verlassenden Streulichtanteile werden auf die GaAs – Kathode eines RCA 31034 Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) abgebildet. In einem Hochfrequenzvorverstärker werden die photoelektrischen Pulse verstärkt und anschließend in einem Ratemeter gezählt. Das entsprechende Analogsignal wird an einen Schreiber ausgegeben. Ein Schrittmotor (M) dreht die gemeinsame Achse der beiden Gitter (subtraktive Dispersion).

Für Auswertung und Beurteilung von Raman – Spektren ist die Kenntnis der spektralen Empfindlichkeit $\varepsilon(\nu)$ der Apparatur erforderlich. Die Größe $\varepsilon(\nu)$ wird im wesentlichen durch die frequenzabhängige SEV – Sensibilität und durch die optischen Eigenschaften der Beugungsgitter bestimmt. Sie ist daher charakteristisch für jede Raman – Apparatur und wie aus Abb. 4.2. hervorgeht, stark von der Polarisationsrichtung des analysierten Lichts abhängig. Zur Bestimmung der spektralen Empfindlichkeit wurde die Strahlung einer geeichten Wolframbandlampe (T = 2000 K) auf den Eintrittsspalt des Monochromators abgebildet. Das aufgezeichnete Spektrum wurde anschließend durch die Intensität des schwarzen Strahlers derselben Temperatur T dividiert (Brandmüller und Schrötter 1957), unter Berücksichtigung der spektralen Bandbreite. Auffallend ist der gitterbedingte Einbruch der Transmission des Spektrographen um 525 nm sowie ein deutliches Maximum bei 507 nm, bei zu den Gitterstrichen senkrechter Polarisation (Woodsche Anomalie!).

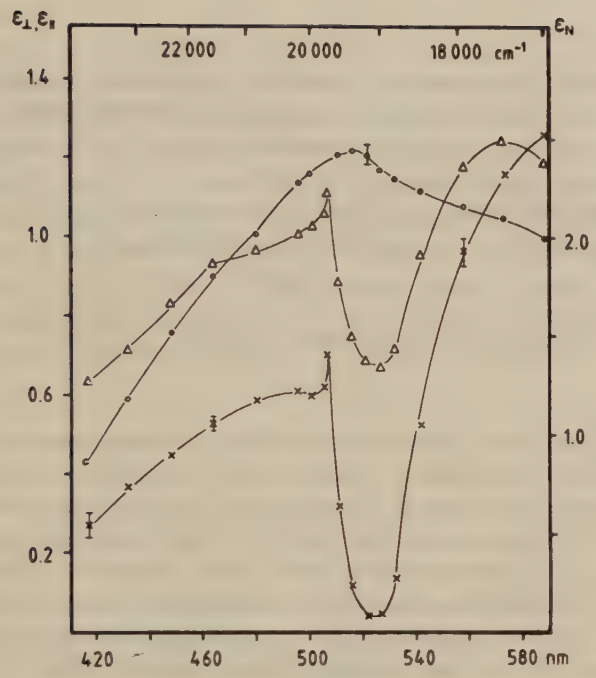


Abb. 4.2.: Spektrale Empfindlichkeit des Detektorsystems der Raman-Apparatur

△ : ε_N (ν) ohne Analysator

× : $\varepsilon_\perp$ (ν) Analysator ⊥ Gitterstrichen

O : $\varepsilon_\parallel$ (ν) Analysator ∥ Gitterstrichen

4.3. Raman – Streuanordnungen und Probentechniken

In diesem Kapitel werden verschiedene Meßtechniken vorgestellt, die zur Registrierung der nachfolgend diskutierten Raman – Spektren führten. Ihre Auswahl ist wesentlich durch die Notwendigkeit bestimmt, die im Resonanzeffekt stark absorbierenden Proben nach Möglichkeit zu schonen, um eine Zersetzung der photolabilen Pigmente oder eine Schädigung der lebenden Zellen im Laserfokus zu vermeiden. Dies wurde auf verschiedene Weisen erreicht.

4.3.1. Die Methode des streifenden Einfalls

Mit Hilfe dieser Streuanordnung wurde ein Phasenübergang an lebenden Zellen (Kap. 6.3.) untersucht. Dabei trifft der Erregerstrahl unter einem möglichst spitzen Winkel auf die optisch dichte Probenoberfläche (Lutz 1974) in einem 90^0 – Streuexperiment nach Abb. 4.1. Das Streuzentrum erscheint nun länglich in der Ebene des Eintrittsspalts gestreckt, sodaß ein möglichst großer Teil der Probenoberfläche zum Raman – Signal beiträgt. Durch Abschließen der Küvette mit einem Quarzfenster, das vorsichtig an die Algenzellpaste angedrückt wurde, konnte eine glatte Probenoberfläche geschaffen werden. Wegen der starken Absorption sowohl des Erregerlichts als auch des Streulichts (Reabsorption) in den Algenzellen, lassen sich auf diese Weise die Raman – Streuintensitäten bei gegebener Erregerintensität optimieren. Ohne Kühlung der Probe ist dieses Meßverfahren bei Chlorophyllen und ganzen Zellen auf Erregerintensitäten von einigen mW/mm^2 beschränkt (Lutz 1979). Durch Übergang zu Tieftemperaturmessungen wird neben einer Verbesserung der Auflösung auch für eine thermische Entlastung der Probe gesorgt. Daß dennoch ab einer kritischen Laserleistung die Möglichkeit von Probenveränderungen nicht außer Acht gelassen werden darf, zeigt Kap. 6.3.

4.3.2. Durchflußtechnik

Eine andere Möglichkeit, die Algenzellen während der RR - Messung vor Schädigung durch das Laserlicht zu bewahren, ist der Aufbau einer Durchflußanlage. Wie in Abb. 4.3. zu sehen, wird dabei die Zellsuspension in einem geschlossenen Kreislauf durch eine Durchflußküvette gepumpt, welche an die Probenstelle (P) (Abb. 4.1.) gebracht wird. Jede einzelne Algenzelle befindet sich damit nur kurzfristig ($t < 10^{-2}$ sec) im Laserfokus. Diese Probentechnik hat den Vorteil, daß während der Raman - Messung die Wachstumsparameter wie Begasung oder pH - Wert der Nährlösung, definiert eingestellt werden können. Leider lassen sich jedoch bei Zimmertemperatur nur wenige Raman-Linien an ganzen Zellen beobachten.

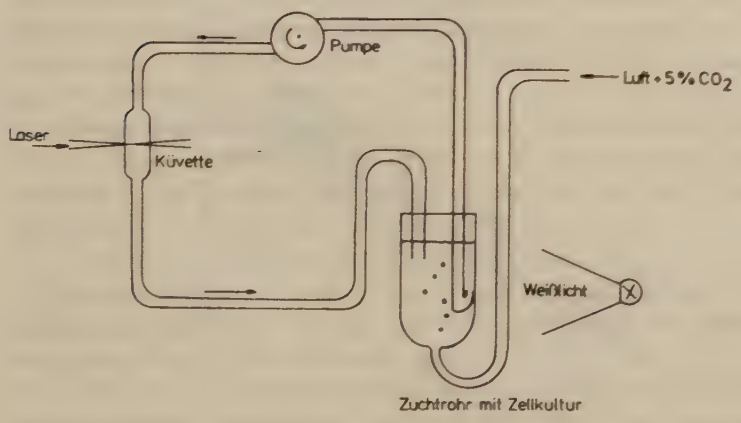


Abb. 4.3.: Durchflußanlage für in vivo Resonanz-Raman-Messungen

4.3.3. Zweikanal – Oberflächenscanning – Technik

Der Grundgedanke, die RR – Probe durch Bewegung im Streuzentrum zu entlasten, führte zunächst zu rotierenden Küvetten (Kiefer und Bernstein 1971a, 1971b, Kiefer et al. 1975). Für die Untersuchung von Pigmenten in ganzen Zellen ist es jedoch notwendig die Auflösung durch Abkühlung der Proben zu steigern. Da eine Probenrotation bei tiefer Temperatur nur schwer zu handhaben ist (Dunn et al. 1973, Kiefer 1977), wurde in dieser Arbeit eine Technik verwendet, bei der die Probe im Kryostaten fixiert ist, während das Streuzentrum auf einem Kreis über die Probenoberfläche läuft (Zimmerer und Kiefer 1974). Über die thermische Entlastung hinaus, bietet diese Oberflächenscanning – Technik die Möglichkeit, zwei verschiedene Substanzen gleichzeitig zu messen und zu vergleichen. Dazu muß nur die Probenkammer in zwei Hälften

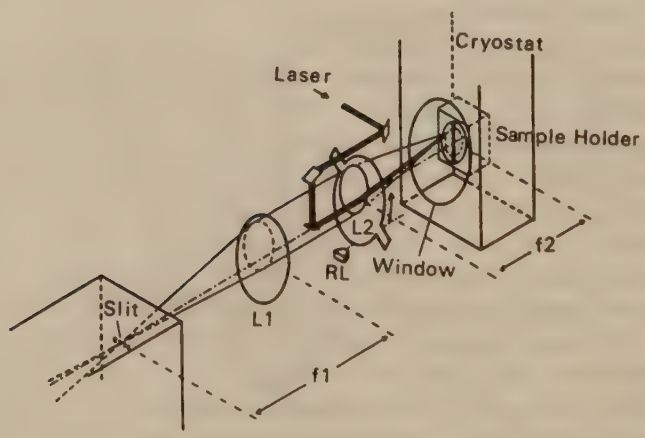


Abb. 4.4.: Schematische Darstellung der Zweikanal-Oberflächenscanning-Technik; RL = Reflexlichtschranken für Kanalumschaltung; Linse L_1; Brennweite f_1 = 400 mm; rotierende Linse L_2, f_2 = 50 mm; Drehzahl ca. 1000 Upm.

unterteilt werden und eine geeignete Zweikanalregistrierung eingesetzt werden. Den schematischen Aufbau einer solchen Anordnung zeigt Abb. 4.4 (Wagner und Waidelich 1986).

Im Gegensatz zu Abb. 4.1. handelt es sich hier um eine 180^0 – Streuung. Der vom Laser kommende Erregerlichtstrahl wird über der optischen Achse umgelenkt und verläuft zunächst oberhalb der rotierenden Linse L_2 in Richtung Monochromator. Dann wird er nach unten abgelenkt und trifft auf einen kleinen, auf der optischen Achse befindlichen, Spiegel. Danach durchtritt er die rotierende Linse L_2 azentrisch und wird auf die Probenoberfläche im Kryostaten fokussiert. Das Streulicht wird von derselben Linse gesammelt und von L_1 auf den Eintrittsspalt des Doppelmonochromators abgebildet. Durch die Rotation der Linse L_2 bewegt sich das Streuzentrum auf einem Kreis. Die unterteilte Tieftemperaturküvette in Abb. 4.4. kann mit zwei verschiedenen Proben versehen werden. Nun muß noch dafür gesorgt werden, daß beim Wechsel von einer Probenkammerhälfte zur anderen ein Schaltimpuls für die Ansteuerung eines Zweikanal – Photonenzählers erzeugt wird. Dazu wurde die Fassung der rotierenden Linse L_2 mit zwei Blenden versehen, die abwechselnd jeweils im Umschaltpunkt den Erregerstrahl ausblenden und einen Puls an einer Reflexionslichtschranke RL (TIL 139) auslösen. Der Schaltplan für die Lichtschranken und die Pulsverstärkung findet sich im Anhang B. Auf diese Weise lassen sich zwei getrennte Signale registrieren. Der Zweikanal – Photonenzähler (Photonic) ist in der Lage die Differenz und den Quotienten der Signale zu bilden (Kiefer und Topp 1974). Damit sind folgende Anwendungen auch bei tiefen Temperaturen möglich:

- Durch Differenzbildung lassen sich aus *in vitro* RR – Spektren die Lösungsmittelbeiträge eliminieren. Allerdings muß dabei gegebenenfalls der Einfluß der Reabsorption nachträglich berücksichtigt werden.
- Zur Bestimmung von REPs in biologischen Proben kann die zweite Probenkammer mit einer nichtresonanten Referenz gefüllt werden, deren Linien dann einen Intensitätsstandard darstellen (vgl. Kap. 7).
- Verschieden behandelte biologische Proben lassen sich gleichzeitig Ramanspektroskopisch untersuchen und auf Veränderungen überprüfen.

Verglichen mit der Methode des streifenden Einfalls ist hier natürlich der Einfluß der Absorption auf die Signalintensitäten größer. Man erhält dadurch ein etwas kleineres Signal / Rausch – Verhältnis, das sich jedoch leicht durch höhere Erregerintensitäten kompensieren läßt. Mit rotierender Linse konnten bei 100 K bis zu 500 mW Laserleistung in die Proben fokussiert werden, ohne die Pigmente in den Algenzellen zu verändern. Aufgrund der einfachen Geometrie lassen sich die Reabsorptionseffekte leicht korrigieren (Shriver und Dunn 1974).

5. Resonanz – Raman – Spektren von Photosynthesepigmenten *in vitro*

Die RR – Spektren der wichtigsten Antennenpigmente wurden *in vitro* registriert. Sie werden nachfolgend diskutiert, wobei der Schwerpunkt auf Chl c liegt, dessen RR – Spektrum sowohl *in vitro* als auch *in vivo* erstmals aufgezeichnet werden konnte. Bandenzuordnungen für Chl c werden vorgeschlagen.

5.1. Die Chlorine Chlorophyll a und Chlorophyll b

Aus den Absorptionsspektren (Abb. 2.8) ergeben sich zunächst mehrere Möglichkeiten RR – Spektren an Chl a und Chl b zu beobachten. Wegen der starken Fluoreszenz mit Maximum um 700 nm, scheidet eine Anregung im Bereich der Q – Banden aus. Resonanzanregung in die Soret – Bande (B_x, B_y) hingegen ermöglicht die Registrierung von RR – Spektren, wie Abb. 5.1 zeigt. Das Chl a Spektrum wurde mit der in 4.3.3. beschriebenen Scanning – Technik bei einer Probentemperatur von 86 K aufgenommen. Es konnte auf die Zweikanalregistrierung verzichtet werden, da sich Chl a in Aceton sehr gut löst ($2 \cdot 10^{-3}$ Mol/l). Damit traten keine Lösungsmittellinien im RR – Spektrum auf.

Dies gilt auch für Chl b, dessen RR – Spektrum in Abb. 5.2 zu sehen ist. Trotz der starken Beeinflussung des π – Elektronensystems (Abb. 2.7) durch die Carbonylgruppe können Ähnlichkeiten im Vergleich mit den Raman – Frequenzen von Chl a festgestellt werden.

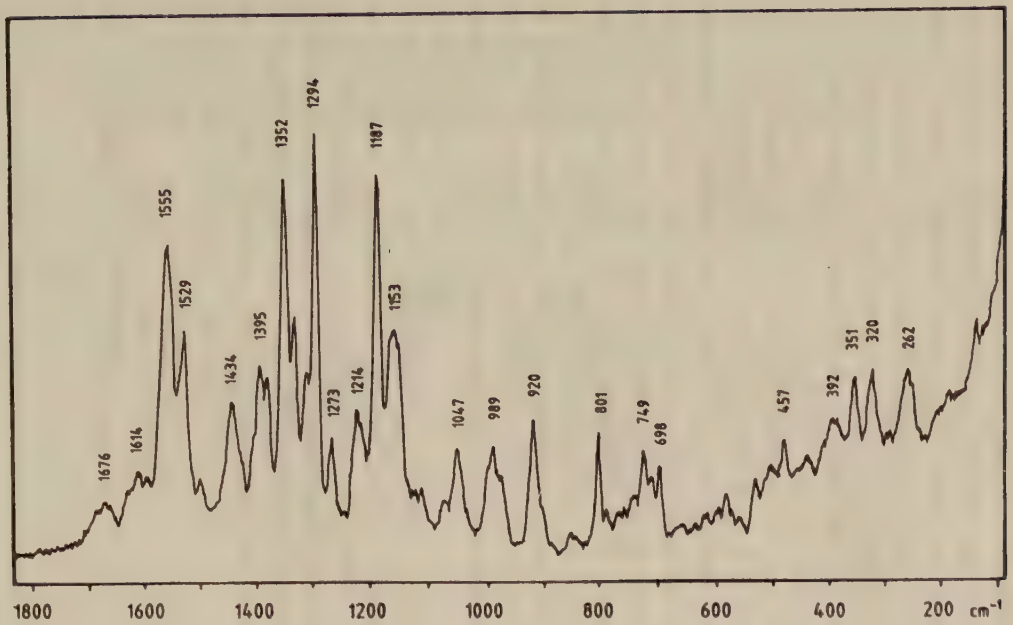


Abb. 5.1.: Resonanz-Raman-Spektrum von Chlorophyll a, monomer in Aceton; Konz. = $5*10^{-3}$ Mol/l, T = 86 K, λ_i = 457,9 nm, I_i = 160 mW, I_{sm} = 8200 cps, ZK = 2 sec, spektr. Auflösung 10 cm^{-1}.

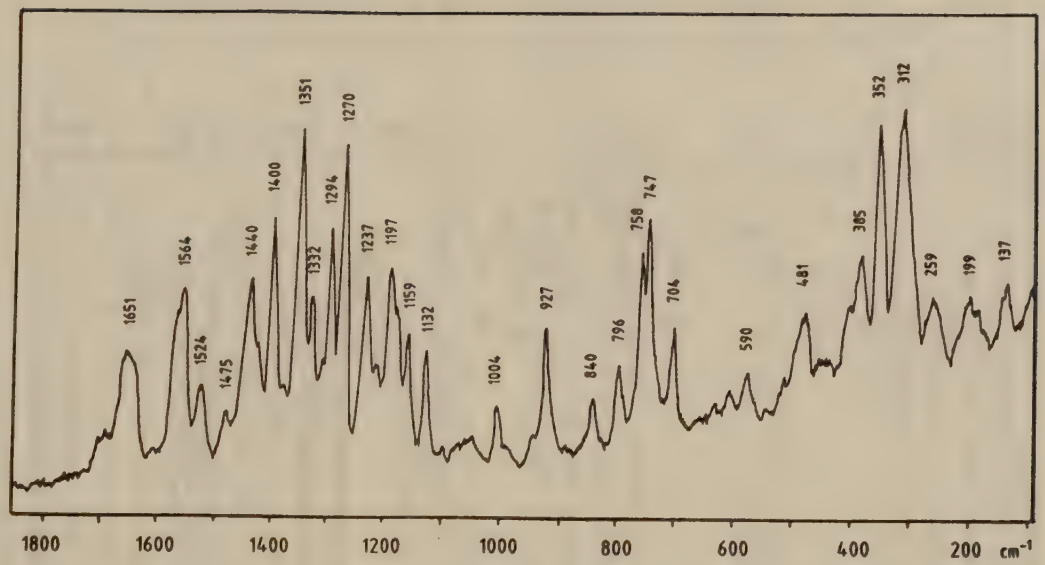


Abb. 5.2.: Resonanz-Raman-Spektrum von Chlorophyll b, monomer in Aceton; Konz. = $5*10^{-3}$ Mol/l, T = 22 K, λ_i = 476,5 nm, I_i = 160 mW, I_{em} = 8200 cps, ZK = 2 sec, spektr. Auflösung 10 cm^{-1}.

Die Raman - Linien der Spektren in Abb. 5.1 und Abb. 5.2 lassen sich auf ebene Schwingungen des Chloringerüsts und dessen Liganden zurückführen. Sie koppeln stark mit den in der Molekülebene liegenden elektronischen Übergängen B_x und B_y des π - Elektronensystems und werden daher im Raman - Effekt resonant verstärkt. Dies gilt insbesondere für die totalsymmetrischen Moden. Lutz (1974) konnte zeigen, daß die Depolarisationsgrade der stärksten Linien Soret - angeregter RR - Spektren von Chl b alle unter 0.5 liegen.

Für die Zuordnung der ebenen Gerüstschwingungen ist eine Normalkoordinatenanalyse notwendig, welche aber auch für einfache symmetrische Chlorine mit der Symmetriegruppe C_{2v} (mm2 int. Schreibweise) noch aussteht. Normalkoordinatenanalysen einfacher Porphyrine (Ogoshi et al. 1972, Sunder und Bernstein 1976, Bernstein 1979) lassen sich jedoch nur bedingt auf Chlorophylle niederer Symmetrie anwenden. Hinweise auf homologe Linien bei Chl a und NiOEP wurden dennoch gefunden (Lutz 1984). So können Zuordnungen nur durch Vergleiche mit RR - Spektren ähnlicher und gezielt modifizierter ($^{14}N \rightarrow {}^{15}N$, $^{24}Mg \rightarrow {}^{26}Mg$) Chlorophylle und mit zusätzlichen Informationen aus IR - Absorptionsmessungen und Röntgenstrukturanalysen grob vorgenommen werden. Die wichtigsten RR - Arbeiten an Chl a und Chl b gehen auf Lutz zurück (1974,1977,1979). Eine Zusammenfassung vorläufiger Bandenzuordnungen finden sich bei Lutz (1984).

Neben den Chlorinmoden lassen sich in Abb. 5.1 und Abb. 5.2 einige Raman - Linien als Gruppenfrequenzen der peripheren Substituenten identifizieren. Dazu gehören die Ketogruppe an Pos. 9 des Makrorings mit 1700 cm^{-1} und zusätzlich bei Chl b die Frequenz der Carbonylgruppe bei 1662 cm^{-1}. Außerdem konnte durch $^{24}Mg \rightarrow {}^{26}Mg$ Substitution gezeigt werden (Lutz et al. 1975), daß einige der Moden um 300 cm^{-1} Mitbewegungen des Mg - Atoms beinhalten.

5.2. Das Porphyrin Chlorophyll c

Im Unterschied zu anderen Chlorophyllen besitzt Chl c (Chl c_1 + Chl c_2) eine höhere Symmetrie. Sein delokalisiertes π - Elektronensystem kommt der D_{4h} - Gruppe symmetrischer Porphyrine trotz der Substituenten sehr nahe. Daher unterscheidet sich das RR - Spektrum (Abb. 5.3) wesentlich von den oben

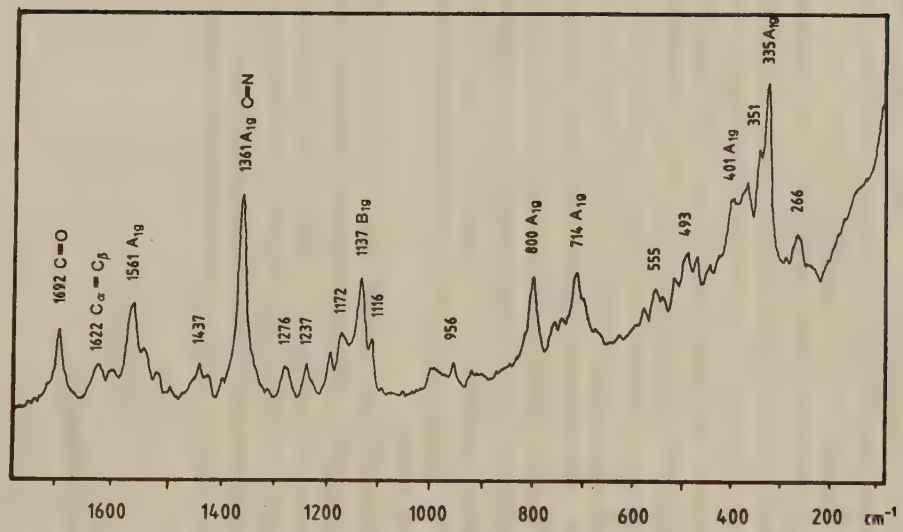


Abb. 5.3.: Resonanz-Raman-Spektrum von Chlorophyll c; monomer in Aceton; totale Konz. = $8*10^{-4}$ Mol/l, Chl c_1 : Chl c_2 = 2:1, T = 80 K, λi = 457,9 nm, I_i = 170 mW, I_{sm} = 8200 cps, ZK = 4 sec, Spektr. Auflösung 10 cm^{-1}.

gezeigten Spektren. Wegen der schlechten Löslichkeit des Chl c wurde hier der Beitrag des Acetons durch die Zweikanaltechnik abgezogen.

Für Chl c lassen sich die Bandenzuordnungen auf der Basis von Normalkoordinatenanalysen diskutieren, welche Abe et al. (1978) und Kitagawa et al. (1978) für NiOEP durchführen konnten. Es gelang den Autoren, hochaufgelöste Spektren von NiOEP und $Ni^{15}OEP$ zu registrieren und eine Reihe von Obertönen und Kombinationsbanden zu identifizieren. Mit diesen Daten und den IR – Messungen von Ogoshi et al. (1972) konnten dann die Frequenzen aller 53 ebenen Fundamentalschwingungen des Porphyringerüsts berechnet werden. Die Übereinstimmung mit dem Experiment war gut.

Im Fall des Chl c kann davon ausgegangen werden, daß die D_{4h} – Symmetrie des π – Elektronensystems, welches für die Resonanzverstärkung entscheidend ist, durch die zusätzlichen Liganden nur wenig gestört wird. Diese Annahme wird durch mehrere Fakten gestützt. Das Absorptionsspektrum (Abb. 2.8) ist typisch für symmetrische Porphyrine. Die Chl c Komponenten weisen bezüglich der Lage ihrer Absorptionsmaxima in Aceton nur geringe Unterschiede auf, nämlich 2.5 nm, 0.3 nm und 0.3 nm jeweils für die B, Q(0 – 1) und die Q(0 – 0) Bande (Jeffrey 1969). Damit ist auch nur ein geringer Einfluß der zusätzlichen Vinylgruppe des Chl c_2 auf das RR – Spektrum zu erwarten. Es lassen sich an Abb. 5.3 Analogien mit den RR – Spektren anderer Soret – angeregter symmetrischer Porphyrine erkennen.

Tabelle 5.1 zeigt die Charaktere der Symmetrieelemente der Punktgruppe D_{4h}. Mit der idealisierten Annahme einer D_{4h} – Symmetrie verteilen sich die ebenen Gerüstschwingungen auf die Rassen A_{1g}, A_{2g}, B_{1g}, B_{2g} und E_u. Wegen des Inversionszentrums sind die E_u und A_{2u} Schwingungen rein IR – aktiv während die Moden der A_{1g}, B_{1g} und B_{2g} Symmetrie nur Raman – aktiv sind. Die A_{2g} – Moden, deren Tensor 2. Stufe antisymmetrisch ist, können im Resonanz – Raman – Effekt zusätzlich beobachtet werden (Placzek 1934). Sie verursachen invers polarisierte Linien im Raman – Spektrum mit Depolarisationsgraden $\rho > 3/4$ (vgl. 2.1.3). Beobachtbar werden A_{2g} – Moden zusammen mit den nichttotalsymmetrischen Moden B_{1g} und B_{2g} bei resonanznaher Anregung in die Q(1 – 0) Bande (Abb. 2.8) von symmetrischen Porphyrinen (Spiro und Strekas 1974).

Tab. 5.1.: Charaktertabelle der Punktgruppe $D_{4h} = \frac{4}{m}\frac{2}{m}\frac{2}{m}$

D_{4h}	E	$2C_4$	C_2	$2C_2'$	C_2''	i	$2S_4$	σ_h	$2\sigma_v$	$2\sigma_d$		
A_{1g}	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		$\alpha_{xx}+\alpha_{yy}, \alpha_{zz}$
A_{2g}	1	1	1	−1	−1	1	1	1	−1	−1	R_z	
B_{1g}	1	−1	1	1	−1	1	−1	1	1	−1		$\alpha_{xx}-\alpha_{yy}$
B_{2g}	1	−1	1	−1	1	1	−1	1	−1	1		α_{xy}
E_g	2	0	−2	0	0	2	0	−2	0	0	(R_x, R_y)	$(\alpha_{yz}, \alpha_{xz})$
A_{1u}	1	1	1	1	1	−1	−1	−1	−1	−1		
A_{2u}	1	1	1	−1	−1	−1	−1	−1	1	1	T_z	
B_{1u}	1	−1	1	1	−1	−1	1	−1	−1	1		
B_{2u}	1	−1	1	−1	1	−1	1	−1	1	−1		
E_u	2	0	−2	0	0	−2	0	2	0	0	(T_x, T_y)	

Für den Vergleich der Chl c RR – Spektren *in vivo* und *in vitro* eignet sich allerdings nur die Resonanzanregung nahe der B – Bande (Abb. 5.3), da die starke Chl a Fluoreszenz lebender Algenzellen eine *in vivo* Registrierung von RR – Linien im roten Spektralbereich nicht zuläßt. In diesem Fall setzt sich das RR – Spektrum von Porphyrinen wie auch bei Chl a und Chl b vorwiegend aus Linien der A_{1g} – Moden zusammen (Choi et al. 1982a). Ebenso lassen sich die Streckschwingungen der in der Phorphyrinebene liegenden Liganden einer A_{1g} – Symmetrie zuordnen. Letztere bewirken eine Störung des Symmetriezentrums des Makrorings, wodurch Raman – Aktivität auch bei E_u – Moden auftreten kann. Die effektive Symmetrie des Chl c ist demnach C_s. Doch zeigt der Vergleich mit dem RR – Spektrum von NiOEP, daß sie sehr nahe bei D_{4h} liegt.

Aufgrund ihres Depolarisationsgrades lassen sich totalsymmetrische A_{1g} – von nichttotalsymmetrischen Moden unterscheiden. Abb. 5.4 zeigt Depolarisationsmessungen an Chl c. Auch hier wurde die Scanning – Technik (Kap. 4.3.3.) verwendet. Um einen Einfluß der unterschiedlichen spektralen Empfindlichkeit des Monochromators (Abb. 4.2) auf die Bestimmung der Depolarisationsgrade auszuschließen, blieb der Analysator stets in derselben Stellung parallel zu den Gitterstrichen stehen, während die Polarisation des Erregerlichts durch ein $\lambda/2$ – Plättchen um 90° gedreht werden konnte, um die Streuintensitäten $I_{\parallel}$ und $I_{\perp}$ zu beobachten. Das Ergebnis wurde in Tabelle 5.2 zusam –

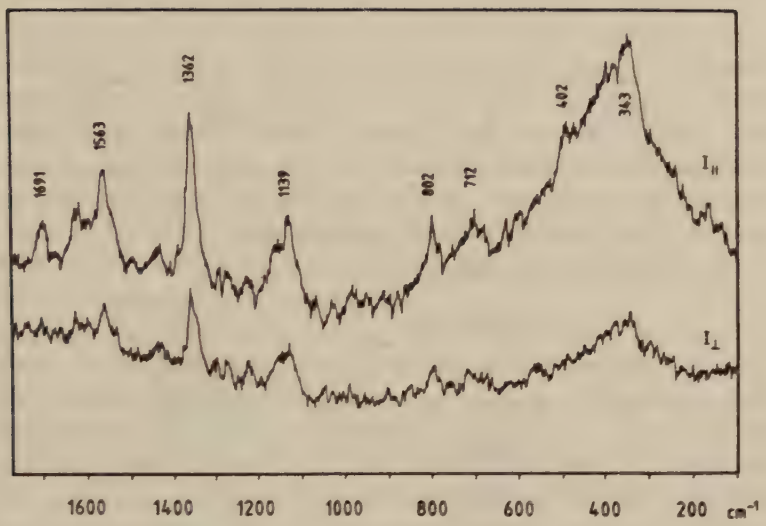


Abb. 5.4.: Zimmertemperatur Resonanz-Raman-Spektren von Chlorophyll (c_1 + c_2) zur Bestimmung des Depolarisationsgrades $\rho = I_{\perp} / I_{\parallel}$, Tot. Konz. = $4*10^{-8}$ Mol/l; Chl c_1: Chl c_2 = 2:1; λ_i = 457,9 nm; I_i = 100 mW; I_{sm} = 1000 cps; ZK = 4 sec.

mengefaßt. Es dient im weiteren als Unterscheidungshilfe für die Diskussion der Bandenzuordnungen des Chl c RR – Spektrums in Abb. 5.3.

Bei den hohen Frequenzen beginnend, läßt sich die 1692 cm^{-1} Linie eindeutig einer Streckschwingung der Keton C = O Gruppe an Position 9 des Makrorings (Abb. 2.7) zuordnen. Diese Linie ist polarisiert. Sie konnte auch in IR – Spektren von Chl c (Dougherty et al. 1970) nachgewiesen werden. Ihr Auftreten im RR – Spektrum deutet darauf hin, daß die Ketogruppe an der Konjugation des π – Elektronensystems teilhat. Dies ist nicht der Fall für die Estergruppe an Pos. 10. Ester C = O Streckschwingungen treten um 1740 cm^{-1} in IR – Spektren auf. Das RR – Spektrum in Abb. 5.3 zeigt an dieser Stelle aber keine Beiträge.

Tab. 5.2.: Depolarisationsgrade der stärksten Chl c RR – Linien

cm^{-1}	ρ		Rasse
335	0.290±0.03	p	A_{1g}
714	0.350±0.07	p	A_{1g}
800	0.430±0.05	p	A_{1g}
1137	0.510±0.03		
1237	0.790±0.12	dp	B_{1g} oder B_{2g}
1276	0.780±0.12	dp	B_{1g} oder B_{2g}
1361	0.470±0.02	p	A_{1g}
1437	0.570±0.11	dp	B_{1g} oder B_{2g}
1561	0.450±0.03	p	A_{1g}
1596	0.540±0.06		Vinyl
1622	0.540±0.06		Vinyl
1692	0.380±0.06	p	A_{1g} Keto

p = polarisiert, dp = depolarisiert

Die C = C Streckschwingung der Vinylgruppe liegt typisch bei 1640 cm^{-1} (Colthup et al. 1975). Choi et al. (1982a) konnten durch C_α und C_β (Abb. 2.7) Deuterierung zeigen, daß die Vinylstreckschwingung in Hämoglobin bei 1610 cm^{-1} auftritt. Außerdem erscheint eine ähnliche Linie um 1621 cm^{-1} bei RR – Untersuchungen an einer Reihe verschiedener Ferroporphyrine durch Desbois et al. (1984a) nur in einem Fall, nämlich bei Fe – Protoporphyrin (FePP), welches als einziges Molekül aus der untersuchten Gruppe Vinylreste trägt und zwar an denselben Stellen des Porphyrinrings wie Chl c_2. Es ist daher

naheliegend, die Linie bei 1622 cm^{-1} des Chl c Spektrums der Vinyl - Streckschwingung zuzuordnen. Da die beiden Vinylgruppen des Chl c_2 räumlich getrennt angeordnet sind (Abb. 2.7), kann in erster Näherung eine direkte Wechselwirkung ihrer Moden vernachläßigt werden. So gesehen tragen also die beiden Komponenten Chl c_1 und Chl c_2 nur unterschiedlich zur Linienintensität von 1622 cm^{-1} bei. Allerdings kann die Kopplung mit lokalen Porphyrin-Moden in den beiden Molekülen verschieden sein. Es wurde nämlich gezeigt (Desbois et al. 1984a), daß die 1622 cm^{-1} Schwingungen von der Art der anderen peripheren Liganden abhängt.

Neben der Vinyllinie liegt eine Raman - Linie gleicher Intensität bei 1596 cm^{-1} in Abb. 5.3, für die derselbe Depolarisationsgrad $\rho = 0.56$ bestimmt wurde. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß auch die Frequenz 1596 cm^{-1} durch die Schwingung eines ähnlichen Substituenten hervorgerufen wird. Eine Aufspaltung der Vinyl - Anteile von Chl c_1 und Chl c_2 kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber wegen der großen Verschiebung (27 cm^{-1}) unwahrscheinlich. Viel eher ist die fragliche Raman - Linie auf die Streckschwingung der C = C Doppelbindung an Pos.7 zurückzuführen (Abb. 2.7). Sie ist in ähnlicher Weise wie die Vinylgruppen mit dem π - Hauptsystem konjugiert, sodaß auch hier ein RR - Signal zu erwarten ist. Die Verschiebung zu niedrigeren Frequenzen kann als eine Lockerung der Bindung durch die angrenzende Säuregruppe erklärt werden. Außerdem tritt eine vergleichbare Linie bei verschiedenen FePPs und bei NiPP (Choi et al. 1982b) nicht auf. Diese Moleküle tragen an Pos. 7 nur eine C - C Einfachbindung. Allerdings liegt 1596 cm^{-1} bereits in einem Frequenzbereich, in dem die energiereichste Skelettschwingung $\nu_{10}(B_{1g})$ nach Abe et al. (1978) auftritt. Es ist also hier keine eindeutige Zuordnung aufgrund der vorliegenden Daten möglich. Daher wurden beide Möglichkeiten in die Zuordnungstabelle (Tab. 5.3) aufgenommen.

Den Linien 1539 cm^{-1} (ν_{11}) und 1561 cm^{-1} (ν_2) lassen sich jeweils Streckschwingungen der äußeren Kohlenstoffatome $C_b - C_b$ des Porphyringerüsts zuordnen (Abe et al 1978, Kitagawa et al 1978). Choi et al (1982a) konnten zeigen, daß die ν_2 - Bande um -9 cm^{-1} verschoben wird, wenn die Äthylgruppen an Pos. 2 und 4 von NiOEP durch Vinylreste ersetzt werden. Daher kann die Frequenz der ν_2 Bande in Abb. 5.3 von dem Chl c_1 : Chl c_2 Verhältnis abhängen, welches hier 2:1 betrug. Der hochfrequente Bereich der Porphyrin RR - Spektren wird von einer starken totalsymmetrischen C_a - N

Tab. 5.3.: Zuordnung der Resonanz-Raman-Frequenzen von Chlorophyll c*

cm^{-1}	Zuordnung**		cm^{-1}	Zuordnung	
1692		$\nu(C=O)$	956		
1622		$\nu(C_\alpha = C_\beta) + \delta(C_b - R)$	800	$\nu_6\ (A_{1g})$	$\delta(C_aC_mC_a)$
1596	$\nu_{10}\ (B_{1g})$	$\nu(C_a = C_m)$ or $\nu(C_{\alpha 7} = C_{\beta 7})$	757	$\nu_{16}\ (B_{1g})$	$\delta(C_aNC_a)$
1561	$\nu_2\ (A_{1g})$	$\nu(C_b = C_b)$	741		
1539	$\nu_{11}\ (B_{1g})$	$\nu(C_b = C_b)$	714	$\nu_7\ (A_{1g})$	$\delta(C_aC_bN) + \delta(C_aC_bR)$
1516	$\nu_{38}\ (E_u)$	$\nu(C_b = C_b)$		or $\nu_{47}\ (E_u)$	$\nu(C_b - CH_3)$
1491			578		
1437			555	$\nu_{49}\ (E_u)$	$\delta(C_aC_bC_b)$
1422			541		
1361	$\nu_4\ (A_{1g})$	$\nu(C_a = N)$	514		
1311		$\delta(C_b - R)$	493		
1276		$\delta(C_b - R)$	472		
1237	$\nu_{13}\ (B_{1g})$	$\delta(C_m - H)$	401	$\nu_{34} + \nu_{35}\ (A_{1g})$	$\delta(C_b - R) + \delta(NMgN)$
1194			377	$2\nu_{35}\ (A_{1g})$	$\delta(C_b - R)$
1172	$\nu_{30}\ (B_{2g})$	$\delta(C_b - CH_3) + \delta(C_b - R)$	351		
1137		$\nu(C_a = N) + \delta(C_aNC_a)$	335	$\nu_8\ (A_{1g})$	$\delta(C_aNC_a)$
1116		$\nu(C_b - C_\alpha) + \delta(C_b - R)$			or $\delta(C_b - CH_3)$
995	$\nu_{45}\ (E_u)$	$\nu(C_a = N) + \nu(C_aC_m)$	266		

* Konzentrationsverhältnis Chl c_1 : Chl c_2 = 2:1, ** Modenbezeichnung entsprechend Abe et al (1978)

(ν_4) Mode dominiert. Sie liegt für Chl c bei 1361 cm^{-1} mit ρ = 0.47 (Tab. 5.2). Die analoge RR – Linie in Ferroporphyrinen und Hämoglobin erwieß sich als sensitiv auf den Oxidationszustand des Fe – Zentralatoms (Spiro und Strekas 1974, Desbois et al. 1984b).

Desbois et al. (1984a) zeigten durch Vergleich der RR – Spektren verschieden substituierter FePPs, daß die Linien der Frequenzregion 1140 – 1300 cm^{-1} von der Art der peripheren Liganden abhängen. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Normalkoordinatenanalyse für NiOEP (Abe et al. 1978) werden daher die Linien bei 1276 cm^{-1}, 1237 cm^{-1} und 1172 cm^{-1} Biegeschwingungen der Liganden gegen das Porphyringerüst zugeordnet. Insbesondere können 1237 cm^{-1} mit der ν_{13} (B_{1g}) und 1172 cm^{-1} mit der ν_{30} (B_{2g}) Mode identifiziert werden. Dies wird auch durch die verfügbaren Depolarisationsdaten (Tab. 5.2) gestützt.

Eine starke Linie bei 1137 cm^{-1} setzt sich nach Desbois et al. (1984a) aus C_a – N Streck – und C_aNC_a Biegeschwingungen zusammen. Die Autoren konnten außerdem durch C_α – Monodeuterierung an FePP zeigen, daß eine Linie um 1120 cm^{-1} einen starken Vinylanteil trägt. Eine vergleichbare Bande tritt bei 1116 cm^{-1} in Abb. 5.3 auf.

Im mittleren Frequenzbereich lassen sich die stärksten Linien bei 800 cm^{-1} und 714 cm^{-1} A_{1g} – Rassen zuordnen. Der Notation Abes folgend, werden sie mit ν_6 und ν_7 (Tab. 5.3) bezeichnet. Letztere wird von einer ebenen Deformationsschwingung der Pyrrolringe hervorgerufen. Sie ist im RR – Spektrum von einer E_u- Schwingung überlagert. Dies könnte ein Grund für die Verbreiterung dieser Linie sein. Daneben muß beachtet werden, daß die homologe Mode in Ferroporphyrinen beträchtliche Verschiebungen bei Ersetzung der 2 und 4 Vinylgruppen durch Äthylreste zeigt (Desbois et al. 1984a).

Die stärkste Linie unter den niedrigen Raman – Frequenzen des Chl c Spektrums in Abb. 5.3 ist totalsymmetrisch (Tab. 5.3) und kann offensichtlich mit der ν_8 – Mode identifiziert werden. Abe et al. (1978) errechneten als Hauptanteil dieser Fundamentalschwingung eine ebene Biegeschwingung der C_b Substituenten. Später konnten Desbois et al. (1984a) allerdings zeigen, daß im Fall der Hämfarbstoffe die homologe Bande von elektronischen Effekten der peripheren Gruppen abhängt, jedoch nicht von deren Massen. Außerdem verschiebt sich die Linie bei $^{14}N \rightarrow {}^{15}N$ Substitution der Pyrrole. Es muß daher auch eine Deformationsbewegung des inneren Teils des Porphyrins mit der ν_8 – Mode verbunden sein. Dies hat eine Mitbewegung des Zentralmetallatoms

zur Folge. Im Vergleich der RR – Spektren von NiOEP und NiPP wurde eine Verschiebung dieser Linie von 5 cm^{-1} festgestellt (Choi et al. 1982a). Folglich könnte die Schulter bei 351 cm^{-1} in Abb. 5.3 auf einen unterschiedlichen Beitrag der beiden Chl c Komponenten hinweisen. Der beobachtete Frequenzabstand (16 cm^{-1}) erscheint allerdings fast zu groß um eine derartige Deutung zuzulassen. Darüberhinaus wurde eine Aufspaltung dieser Größenordnung der ν_8 – Mode auch an monomolekularem Cytochrom c (Yu und Srivastava 1980, Srivastava et al. 1981) beobachtet. Die Autoren benutzten für ihre RR – Messung ein OMA2 – System und lösten damit eine Reihe solcher Bandenaufspaltungen in der Frequenzregion 300 – 425 cm^{-1} auf. Die Identifizierung einiger dieser Linien mit Differenzkombinationsbanden, wie von Friedman und Hochstrasser (1973) zunächst vorgeschlagen, erscheint aufgrund der neueren Ergebnisse nicht angebracht.

Nach der Normalkoordinatenanalyse von Kitagawa et al. (1978) können Kombinationsbanden der niedrigsten Fundamentalschwingungen in dem betrachteten Bereich des RR – Spektrums auftreten. Dementsprechend wird für die Linien 377 cm^{-1} und 401 cm^{-1} in Abb. 5.3 jeweils die Zuordnung $2\nu_{35}$ und $\nu_{34} + \nu_{35}$ vorgeschlagen.

Eine Übersicht der beobachteten RR – Frequenzen für Chl c gibt die Tabelle 5.3 (Wagner und Waidelich 1986). Die oben diskutierten Bandenzuordnungen wurden eingetragen. Sie haben vorläufigen Charakter. Verbleibende Unsicherheiten in der Zuordnung lassen sich durch weitere umfangreiche RR – Untersuchungen an verschiedenen Modifikationen der isolierten Komponenten Chl c_1 und Chl c_2 verringern.

5.3. β – Carotin

Von allen Carotinoiden ist das β – Carotin in PS – Zellen am häufigsten zu finden. Es dominiert daher in RR – Spektren ganzer Zellen (Kap. 6). Für die Diskussion ist die detaillierte Kenntnis eines *in vitro* RR – Spektrums unerläßlich.

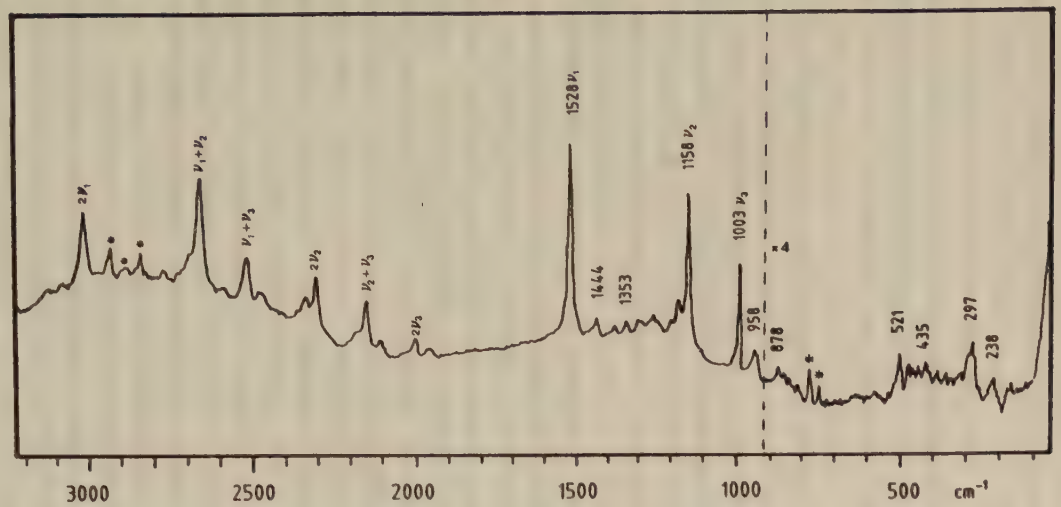


Abb. 5.5.: Resonanz-Raman-Spektrum von ß-Carotin in Isopentan; Konz. = $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l, T = 82 K, λ_i = 476,5 nm, I_i = 100 mW, I_{sm} = 8200/ 32800 cps, ZK = 2 sec, spektr. Auflösung 10 cm^{-1}; Der Bereich 50 - 900 cm^{-1} wurde mit 4- facher Empfindlichkeit registriert, Isopentan-Linien sind mit * gekennzeichnet.

Abb. 5.5 zeigt das Ergebnis einer RR – Messung an β – Carotin in Isopentan, durchgeführt bei einer Probentemperatur von 82 K. Auffallend, im Unterschied zu den bisher besprochenen Chlorophyllen, ist das starke Anschwingen von Obertönen, beobachtbar im Frequenzbereich 2000 – 3100 cm^{-1} (Abb. 5.5). Dies deutet auch auf große Verschiebungen der Kerngleichgewichtslagen M_a in (21) beim Übergang vom a_{1g} – Grundzustand in den ersten elektronisch angeregten Zustand (b_{1u}) hin. Das Molekül wird dabei längs seiner Achse gestreckt. Bei Anregung um 500 nm liegt Resonanz mit nur einem elektronischen Zustand vor. In diesem Fall wird FC – Streuung beobachtet. Die Intensität wird durch Albrechts A – Term (8) beschrieben, wie Inagaki et al. (1974) zeigen konnten. Wegen des Symmetriezentrums gilt auch hier das Ausschließungsprinzip bezüglich IR – und Raman – Aktivität der Moden.

Obwohl bereits 1932 das erste RR – Spektrum durch von Euler und Hellström veröffentlicht wurde, konnten Bandenzuordnungen für einen Großteil der Raman – Linien erst nach einer Normalkoordinatenanalyse durch Saito und Tasumi (1983b) für Raman – Frequenzen >750 cm^{-1} vorgenommen werden. Die Autoren legten ihren Rechnungen eine vereinfachte Molekülstruktur mit D_{2h} – Symmetrie zugrunde und verglichen ihr Ergebnis mit RR – Spektren, die sie in einem Frequenzbereich 40 – 5800 cm^{-1} registriert hatten (Saito et al. 1983a). Kürzlich konnten Hayashi et al. (1985) Saitos Ergebnisse durch Messungen an ^{13}C – und ^{2}H – substituierten Carotinoiden bestätigen. Demzufolge werden die Linien ν_1(1528 cm^{-1}), ν_2(1158 cm^{-1}) und ν_3(1003 cm^{-1}) jeweils der C = C, der C – C Streckschwingung und phasengleichen, ebenen Knickschwingungen der CH_3 – Gruppen zugeordnet. In dem Bereich 1370 – 1470 cm^{-1} liegen symmetrische und asymmetrische Deformationsschwingungen der CH_3 – Reste vor und zwischen 1100 cm^{-1} und 1370 cm^{-1} dominieren C – C Streck – und ebene CH Biegeschwingungen. Die Linien um 960 cm^{-1} werden aus der Molekülebene herausführenden Verwindungen der CH Bindungen zugeschrieben. Die schwachen niederfrequenten Banden im Bereich 150 – 600 cm^{-1} lassen sich bisher nicht zuordnen.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß das RR – Spektrum von β – Carotin stark von der räumlichen Struktur des Moleküls abhängt. Die RR – Spektren verschiedener cis – trans Isomere des β – Carotins wurden von Koyama et al. (1982) eingehend untersucht.

6. *In vivo* Resonanz – Raman – Untersuchungen

6.1. Die Besetzung der Schwingungsniveaus der Carotinoide in *Chlorella* – Zellen bei Zimmertemperatur

Auf der Basis seiner theoretischen Arbeiten stellte Fröhlich (1977) die Hypothese auf, daß sich in lebenden Zellen kohärente stehende Wellen niedriger Energie ausbilden können, welche durch metabolische Prozesse gespeist werden. Nachdem Webb et al. (1977) bei Raman – Streuversuchen an lebenden *Escherichia Coli* – Zellen eine deutliche Überhöhung des Anti – Stokes/Stokes Verhältnisses festgestellt hatten, betrachteten sie ihr Ergebnis als Nachweis für derartige kohärente Anregungszustände.

1978 beobachteten Drissler und Macfarlane eine nichtthermische Besetzung der stärksten Molekülschwingungen der Carotinoide in lebenden *Chlorella pyrenoidosa* – Zellen durch Vergleich der Stokes und Anti – Stokesschen Linienintensitäten. Das Intensitätsverhältnis lag danach um 30 % bis 160 % über dem Wert der im thermischem Gleichgewicht erwartet würde. Kinoshita et al. (1980) konnten jedoch einen ähnlichen Effekt mit *Chlorella vulgaris* – Zellen nicht feststellen. Sie hatten in einer sehr sorgfältigen Arbeit die Einflüsse des ω^4 – Gesetzes, der Resonanz und der Absorption explizit berücksichtigt und ihr Ergebnis durch Testmessungen an β – Carotin in Lösung untermauert. Diese widersprüchlichen Ergebnisse wurden allerdings unter leicht voneinander abweichenden experimentellen Bedingungen erhalten. Zum einen handelt es sich in den Arbeiten um verschiedene *Grünalgen* – Stämme und zum anderen differierten die physiologischen Bedingungen, denen die Zellsuspensionen während der Messung ausgesetzt waren. Während Kinoshita et al. (1980) die untersuchte Zellkultur in einer temperaturstabilen Küvette rührten, benutzte Drissler (1978,1981) eine Durchflußanlage um kontinuierlich eine geringe Probenmenge aus einer thermostatisierten, begasten, und beleuchteten Zellkultur zu entnehmen und einer Durchflußküvette für RR – Streuexperimente zuzuführen. Im zweiten Fall kann sicher davon ausgegangen werden, daß die Zellen während der RR – Messung im Stadium größter Stoffwechselaktivität waren.

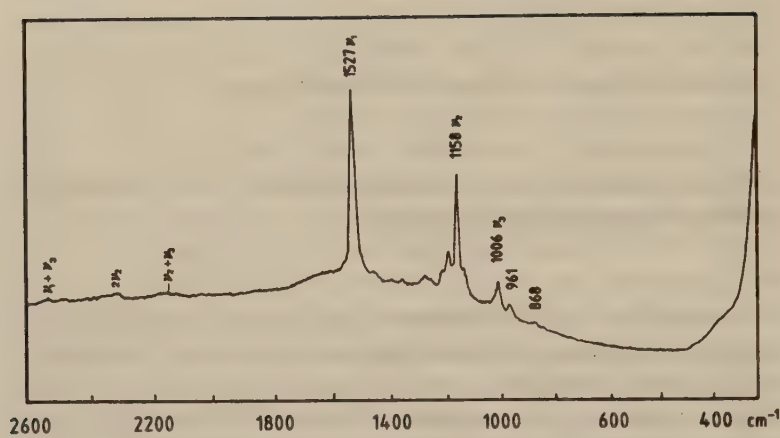


Abb. 6.1.: Resonanz-Raman-Spektrum einer Zellsuspension von Chlorella pyrenoidosa; T = 303 K; λ_i = 514,5 nm; I_i = 1,3 W; I_{sm} = 65500 cps; ZK = 0,25 sec; RR-Frequenzen ± 5 cm^{-1}.

Aus diesem Grund erschien es sinnvoll, die Besetzung der Schwingungsniveaus der Carotinoide unter den von Drissler angegebenen experimentellen Bedingungen an *Chlorella pyrenoidosa* – Zellen erneut zu bestimmen. Dazu wurde die in 4.3.2. beschriebene Durchflußtechnik eingesetzt. Die untersuchten Algen vom Stamm *Chlorella pyrenoidosa* (neuerdings *Chlorella fusca*) wuchsen unter den in 3.2 beschriebenen Bedingungen und wurden für die Messung einer Hellphase entnommen. Ein auf diese Weise bei Zimmertemperatur registriertes RR – Spektrum zeigt Abb. 6.1.

Durch Vergleich mit dem *in vitro* β – Carotin – Spektrum (Abb. 5.5) lassen sich sofort die stärksten Linien identifizieren. Die Oberschwingungen sind bei der verwendeten Erregerwellenlänge (514,5 nm) nur schwach erkennbar. Der gelegentliche Durchzug von Gasblasen durch das 10 mm lange Streuzentrum in der Küvette machte sich bei diesen Abständen von der Rayleigh – Linie nicht mehr im Streuuntergrund bemerkbar. Abb. 6.2 demonstriert ein typisches Anti-Stokes RR – Spektrum, registriert unter denselben experimentellen Bedingungen. Die starken schmalen Linien des Spektrums sind auf Emissionen des Ar^+ –

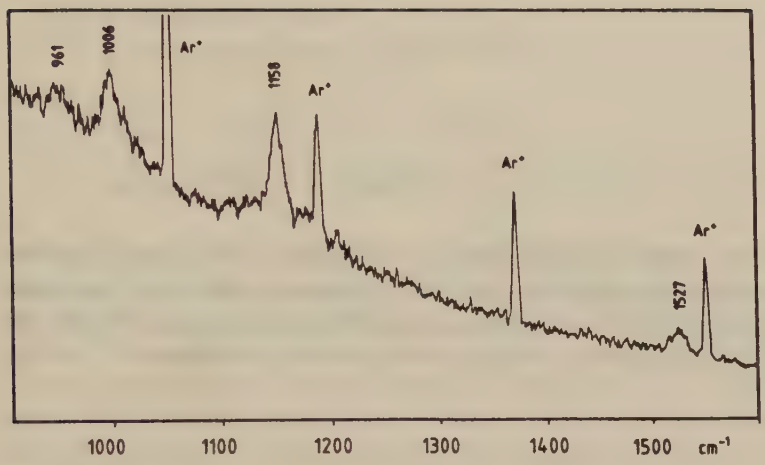


Abb. 6.2.: Anti-Stokes Resonanz-Raman-Spektrum einer Zellsuspension von Chlorella pyrenoidosa; T = 303 K; λ_i = 514,5 nm; I_i = 1,3 W; I_{sm} = 1020 cps; ZK = 1 sec; Plasmalinien des Ar^+-Lasers sind gekennzeichnet; RR-Frequenzen ± 5 cm^{-1}.

Plasmas zurückzuführen. Sie konnten in diesem Stadium der Arbeit nicht unterdrückt werden. Für eine verläßliche Auswertung der Streuintensitäten kommen nur die starken Banden des Anti – Stokes – Spektrums 961 cm^{-1}, 1006 cm^{-1} und 1158 cm^{-1} in Betracht. Im Rahmen der Meßgenauigkeit wurde keine Veränderung der Raman – Intensitäten im Abb. 6.1, 6.2 beobachtet, wenn die Zellkulturen währernd der Hell – oder Dunkelphase aus dem Zuchtteil (4.2.3.) entnommen wurden. Auf dem Wege zur Durchflußküvette sank die Temperatur der im Kulturgefäß auf 31^0 C thermostatisierten Zellsuspension auf 30^0 C ab. In diesem Temperaturbereich entfalten die Zellen ihre maximale Stoffwechselaktivität. Die experimentell beobachteten Intensitäten der Stokes (I_S) und Anti – Stokes (I_{AS}) Linien lassen sich nach (1) schreiben

$$(25) \qquad I_S(\omega_0) = KI_0(\omega_0-\omega_a)^4 |\alpha_S(\omega_0,\omega_a)|^2 N_S f(\omega_0,\omega_0-\omega_a)$$

$$(26) \qquad I_{AS}(\omega_0) = KI_0(\omega_0+\omega_a)^4 |\alpha_{AS}(\omega_0,\omega_a)|^2 N_{AS} f(\omega_0,\omega_0+\omega_a)$$

Hier werden der Öffnungswinkel der beobachteten Streustrahlung $d\Omega$ und andere apparative Konstanten zur Größe K zusammengefaßt. Die Temperaturabhängigkeit steckt in den Besetzungszahlen für den Grundzustand N_S und den angeregten Zustand N_{AS}. Es gilt, in Strenge nur für freie Moleküle,

$$(27) \qquad N_S = N_{AS}+1 = \frac{1}{e^{\frac{\hbar\omega}{kT}} - 1} + 1 \quad .$$

Die Funktion f beinhaltet frequenzabhängige experimentelle Parameter wie die spektrale Empfindlichkeit der Apparatur (Abb. 4.2) und die Absorption der Probe. Im Resonanzfall können die Polarisierbarkeiten α_S und α_{AS} stark voneinander abweichen. Sie lassen sich für Carotinoide in der von Albrecht angegebenen Form (8) schreiben. Durch Einsetzen erhält man die Beziehung

$$(28) \qquad \alpha_S(\omega_0+\omega_a,\omega_0) = \alpha_{AS}(\omega_0,\omega_a+\omega_0)$$

Der Einfluß unterschiedlicher Polarisierbarkeiten läßt sich also eliminieren, wenn die Intensitäten eines bei $\omega_0+\omega_a$ (hier 488 nm) aufgezeichneten Stokes Spektrums mit denen eines bei ω_0 (hier 514 nm) registrierten Anti – Stokes Spektrums verglichen werden. Das theoretisch bei der Temperatur T zu erwartende Besetzungszahlverhältnis P_a

$$(29) \qquad P_a = \frac{N_{AS}}{N_S} = e^{-\frac{\hbar\omega_a}{kT}}$$

wurde daher durch den Ausdruck

$$(30) \qquad \frac{N_{AS}}{N_S} = \frac{I_{AS}(\omega_0)}{I_S(\omega_0+\omega_a)} \; \frac{\omega_0^4}{(\omega_0+\omega_a)^4} \; \frac{f'(\omega_0+\omega_a,\omega_0)}{f'(\omega_0,\omega_0+\omega_a)} \; \frac{\varepsilon(\omega_0+\omega_a)}{\varepsilon(\omega_0+\omega_a-\omega_a)}$$

bestimmt. Hier wurde die Funktion f in einen von den Absorptionseigenschaften der Probe abhängigen Teil f' und einen vom Detektorsystem bestimmten Teil, die spektrale Empfindlichkeit $\varepsilon(\omega)$ aufgespalten. Es wurde darauf geachtet, daß während des Experiments der Laserstrahl auf seinem Weg durch die Probe (Länge l) in unmittelbarer Nähe der Küvettenwand verlief. Dadurch wurde die Reabsorption des Streulichts minimiert. Unter dieser Voraussetzung läßt sich die Funktion f' (Behringer 1967, Strekas et al 1974) näherungsweise schreiben

$$(31) \qquad f'(\omega_0+\omega_a,\omega_0) = f'(\omega_0+\omega_a) = \frac{1-e^{-\mu(\omega_0+\omega_a)cl}}{\mu(\omega_0+\omega_a)cl}$$

wobei c die Zellkonzentration darstellt. Der Absorptionskoeffizient μ wurde in Anlehnung an Experimente von Kinoshita et al.(1980) dem in Abb. 6.4 gezeigten Absorptionsspektrum entnommen.

Die geringe Änderung von μ im Bereich 485 - 490 nm ($\Delta\mu/\mu$ = 0,023) rechtfertigt folgendes Vorgehen. Mit einer Erregerfrequenz ω_0 = (514,5 nm)$^{-1}$ eines Anti - Stokes Spektrums erhalten wir für $\omega_0 + \omega_a$ die Werte (490 nm)$^{-1}$, (489,2 nm)$^{-1}$ und (485,6 nm)$^{-1}$ bezogen auf die Linien 961 cm^{-1}, 1006 cm^{-1} und 1158 cm^{-1}. Es ist daher naheliegend, die Stokes Anregung durch die 488 nm - Emission des Ar^+ - Lasers zu realisiern und damit (28) als Näherung zu verwenden. Die Ergebnisse eines mit 514,4 nm erregten Anti-Stokes Spektrums (Abb. 6.2) und eines mit 488 nm aufgezeichneten Stokes-Spektrums sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

Tab. 6.1.: Besetzungszahlverhältnisse von Carotinoid – Moden in stoffwechselaktiven *Chlorella pyrenoidosa* Zellen

cm^{-1}	$\frac{I_{AS}(\omega_0)}{I_S(\omega_1)}$	$\frac{(\omega_0)^4}{(\omega_1)^4}$	$\frac{f'(\omega_1)}{f'(\omega_0)}$	$\frac{\varepsilon(\omega_0+\omega_a)}{\varepsilon(\omega_1-\omega_a)}$	P_a	$P_t=e^{-\frac{\hbar\omega_a}{kT}}$	$\frac{P_a}{P_t}$
961	0.020±0.004	0.810	0.59±0.012	1.14	0.0109	0.0103	1.05±0.23
ν_3 1006	0.015±0.001	"	"	1.19	0.00858	0.00844	1.02±0.09
ν_2 1158	0.010±0.0005	"	"	0.89	0.00428	0.00412	1.04±0.07

ω_0 = (514.5 nm)$^{-1}$, ω_1 = (488.0 nm)$^{-1}$, T = 30°C

Sie zeigt, daß die aus den Intensitätsverhältnissen mehrerer Carotinoid-Moden bestimmten Besetzungszahlen alle in der bei thermischem Gleichgewicht gültigen Größe vorliegen. Die maximale Abweichung der Mittelwerte vom jeweiligen thermischen Wert betragen dabei 5 %. Die Meßfehler schwanken zwischen 7 und 22 %. Am verläßlichsten ist das Ergebnis für die 1158 cm^{-1} Mode, da für diese Linie sowohl das Stokes als auch das Anti – Stokes Spektrum ein zufriedenstellendes Signal/Rauschverhältnis aufweisen (Abb. 6.1, 6.2).

Damit lassen sich Drissler und Macfarlanes (1978) Ergebnisse nicht bestätigen. Aus ihrer Arbeit geht nicht klar hervor, inwieweit die ω^4 – Abhängigkeit und die spektrale Empfindlichkeit des Detektorsystems berücksichtigt wurden.

6.2. Selektive Beobachtung von Photosynthesepigmenten in RR – Spektren von intakten Zellen bei tiefen Temperaturen

RR – Untersuchungen an Algenzellen bei Raumtemperatur (Abb. 6.1, 6.2) können in erster Linie Aussagen über den Zustand der Carotinoide *in vivo* liefern. Durch Abkühlung der Proben lassen sich auch Chlorophyll – Beiträge in den RR – Spektren der Zellen auflösen, vorausgesetzt, die Erregerwellenlänge wird günstig gewählt. Dies geschah im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl mit *Grünalgen* als auch mit *Diatomeen*. Während die Chlorphyll RR – Spektren der erstgenannten Algengruppe vor allem im Hinblick auf Kap. 6.3 kurz dargestellt werden, nimmt die Diskussion der Ergebnisse an letzterer im folgenden mehr Raum ein, da mit den *Kieselalgen* erstmals RR – Linien von Chlorophyllen aus der braunen Entwicklungslinie der PS – Organismen aufgezeichnet werden konnten.

6.2.1. *Grünalgen*

Das Übersichtsspektrum in Abb. 6.3, registriert an intakten *Chlorella fusca*-Zellen bei 35 K mit 476,5 nm Anregung, zeigt eine wesentlich bessere Auflösung als vergleichbare Zimmertemperaturspektren (Abb. 6.1). Unter diesen experimentellen Bedingungen werden Raman – Linien des Chl b um 320 cm^{-1}

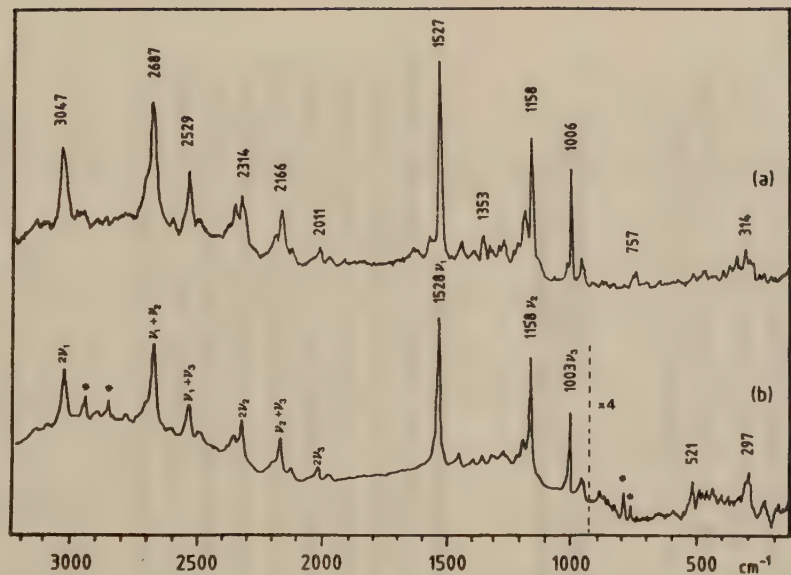


Abb. 6.3.: Übersichts Resonanz-Raman-Spektrum von Chlorella pyrenoidosa, ganze Zellen (a), darunter zum Vergleich ß-Carotin in Isopentan (b) beide mit 476,5 nm Anregung;

(a) T = 23 K; I_i = 60 mW, I_{sm} = 16400 cps, ZK = 1 sec;

(b) Konz = $1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l , T = 82 K, I_i = 100 mW,

I_{sm} =8000 / 32800 cps, ZK = 2 sec;

Lösungsmittellinien sind mit * gekennzeichnet, Resonanz-Raman-Frequenzen ± 5 cm^{-1}.

und 750 cm^{-1} erkennbar. Die Erregerwellenlänge wurde so gewählt, daß maximale Resonanzverstärkung für Chl b vorliegt. Dies läßt sich aus dem Tieftemperatur – Absorptionsspektrum der untersuchten *Chlorella* – Zellen (Abb. 6.4.) ersehen, (vgl. auch die Raman – Anregungsprofile in Abb. 7.4.).

Außer mit Chl b liegt bei 476,5 nm Anregung auch Resonanz mit dem schwingungsaufgespaltenen $b_{1u} \leftarrow a_{1g}$ Übergang der Carotinoide vor. Im Vergleich mit dem darunterliegenden *in vitro* Tieftemperatur – RR – Spektrum von β – Carotin (Abb. 6.3) fällt die große Ähnlichkeit bezüglich der starken Linien

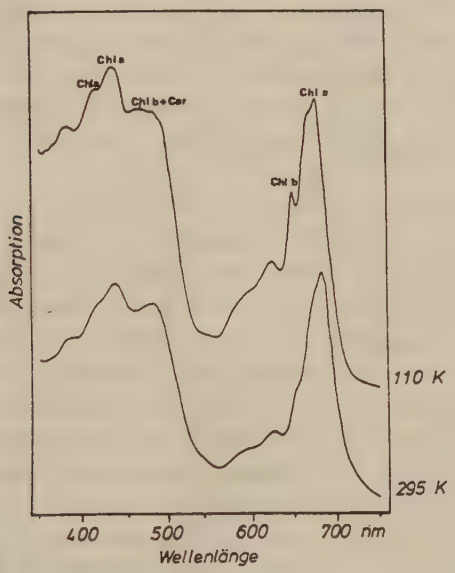


Abb. 6.4.: Absorptionsspektrum ganzer Zellen von Chlorella pyrenoidosa (fusca) bei 295 K und 110 K aus Schiele (1985)

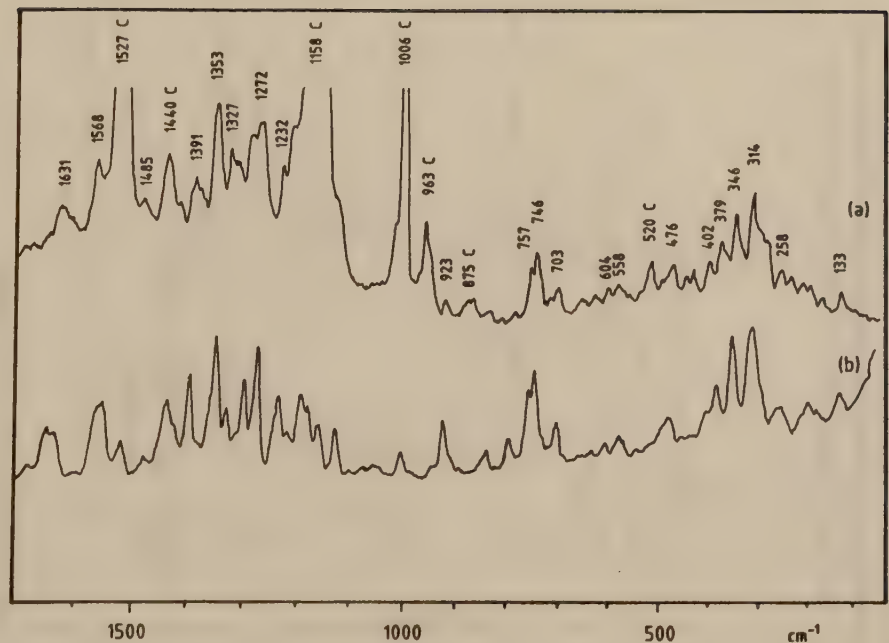


Abb. 6.5.: Resonanz-Raman-Spektren mit 476,5 nm Anregung,

(a) Chlorella pyrenoidosa (fusca), ganze Zellen; T = 86 K;

I_i = 120 mW; I_{sm} = 2050 cps, ZK = 4 sec;

(b) Chlorophyll b, monomer in Aceton; T = 22 K; I_i = 160 mW;

I_{sm} = 8200 cps; ZK = 2 sec;

spektrale Auflösung 10 cm^{-1}, RR-Frequenzen ± 3 cm^{-1}.

auf. Daraus kann geschlossen werden , daß die Schwingungsmoden der Carotinoide nur schwach von der veränderten molekularen Umgebung in der Photosynthesemembran abhängen und daß Antennencarotinoide in der all – trans Form vorliegen, da mit einer cis – trans Isomerisierung wesentliche Veränderungen im RR – Spektrum der Carotinoide einhergehen (Koyama et al. 1982). Im Bereich 1150 – 1500 cm^{-1} überlagern sich Carotin – Linien mit den stärksten Chl b Linien. Aber auch bei 300 cm^{-1} und 520 cm^{-1} sind schwache Carotinoid-Beiträge zum *in vivo* Spektrum Abb. 6.3 feststellbar.

Eine Zuordnung der RR – Linien von Chl b *in vivo* kann durch Vergleich mit *in vitro* Chl b – Spektren versucht werden. Dazu wurden in Abb. 6.5 ein mit großer Empfindlichkeit registrierter Ausschnitt des *in vivo* – Spektrums und darunter ein RR – Spektrum von Chl b in Aceton eingetragen. Trotz des starken Beitrags der Carotinoide lassen sich die Hauptlinien des Chl b zweifelsfrei identifizieren. Unterschiede, welche auf Wechselwirkungen mit molekularen Nachbarn zurückzuführen sind, treten vor allem im Bereich der Keton-Streckschwingungen 1600 – 1670 cm^{-1} und bei den Mg – sensitiven Banden um 320 cm^{-1} auf.

Durch RR – Studien an Chloroplasten verschiedener Zellen grüner Pflanzen und von *Grünalgen* kamen Lutz (1977) und später Gadzhiev et al. (1981) zu dem Ergebnis, daß Chl b in mindestens zwei verschiedenen Gruppen, in denen das Mg – Atom die Koordinationszahl 5 bzw. 6 aufweist, an Protein gebunden vorliegen muß. Frühere Vermutungen, Chl b könne in dimerer oder oligomerer Form im Thylakoiden präsent sein, konnten ausgeschlossen werden.

Wird die Erregerwellenlänge auf 441,6 nm verkürzt, so kommen Chl a Linien im RR – Spektrum von *Chlorella fusca* (Abb. 6.6) zum Vorschein. Ein Blick auf das zugehörige Absorptionsspektrum (Abb. 6.4) zeigt, daß in diesem Fall nahe Resonanz mit der Soret – Bande des Chl a vorliegt. Auch hier treten Abweichungen vom *in vitro* RR – Spektrum (Abb. 6.6d) auf, vor allem im Bereich der (C = O) Schwingungen (1550 – 1650 cm^{-1}) und bei den niederfrequenten Moden mit Mg – Beteiligung (250 – 350 cm^{-1}). Aus der Tatsache, daß die Linie bei 312 cm^{-1} (Abb. 6.6) keine Schulter bei 308 cm^{-1} trägt, kann nach Lutz (1977) geschlossen werden, daß das Mg – Atom 5 – fach koordiniert vorliegt.

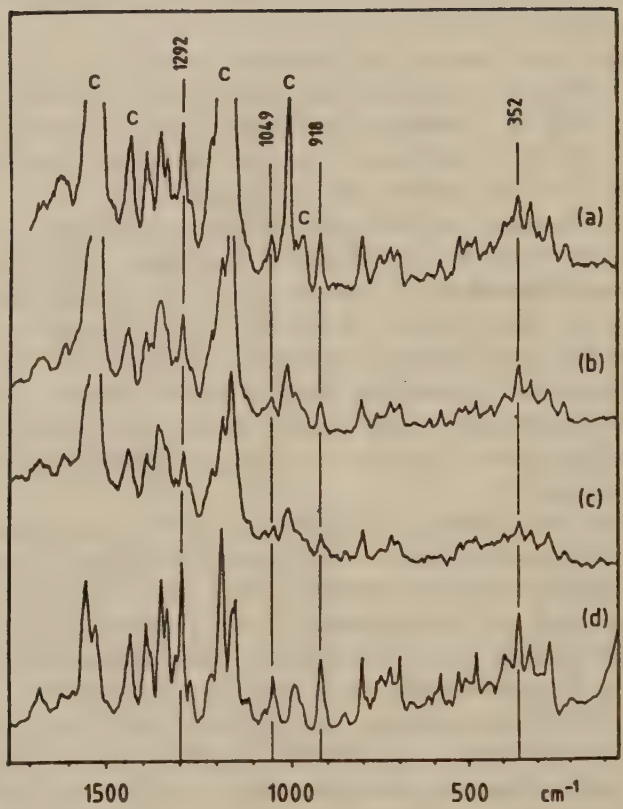


Abb. 6.6.: Resonanz-Raman-Spektren von Chlorophyll a in vivo und in vitro, 441,6 nm Anregung, T = 80 K, (a) Grünalge Chlorella pyrenoidosa (fusca), ganze Zellen; (b) Süßwasserkieselalge Phaeodactylum tricornutum, ganze Zellen; (c) Salzwasserkieselalge Gomphonema Parvulum, ganze Zellen; (d) Chlorphyll a; monomer in Aceton, Konz. = $5*10^{-3}$ Mol/l; Carotinoid-Linien sind mit C markiert, spektrale Auflösung 10 cm^{-1}.

6.2.2. *Kieselalgen*

In die Diskussion des Chl a - Spektrums von *Chlorella* (Abb. 6.6a) lassen sich auch die RR - Spektren der *Diatomeen Phaeodactylum tricornutum* und *Gomphonema parvulum* (Abb. 6.6b,c) miteinbeziehen. Obwohl die *Kieselalgen* eine von *Grünalgen* verschiedene Pigmentzusammensetzung (Abb. 6.7) und einen unterschiedlichen PS - Apparat aufweisen, werden die mit 441,6 nm aufgezeichneten *in vivo* - RR - Spektren bezüglich der Chl a - Anteile vergleichbar. Auch hier kann keine Schulter um 308 cm^{-1} beobachtet werden. Die Auflösung ist allerdings etwas schlechter als in Abb. 6.6a.

Alle mit *Chlorella* beobachteten Chl a - Linien lassen sich mit dieser Einschränkung bei den *Diatomeen* wiederfinden, bis auf den Freqenzbereich der

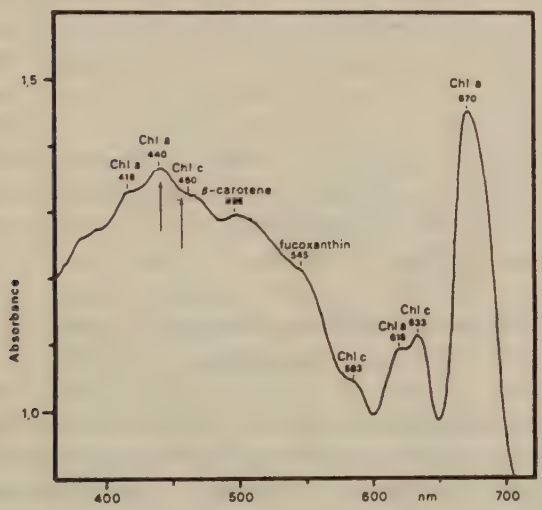


Abb. 6.7.: Absorption ganzer Zellen der Kieselalge Phaeodactylum tricornutum T = 100 K, die Erregerwellenlängen für die Beobachtung der in vivo RR-Spektren von Chl a und Chl c sind durch Pfeile angedeutet.

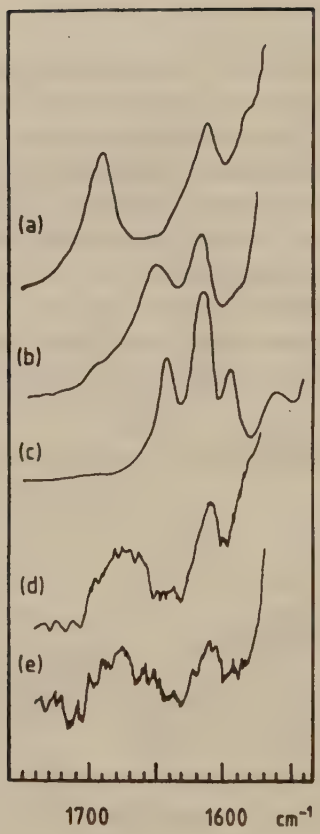


Abb. 6.8.: Resonanz-Raman-Spektren von Chl a, Bereich der Carbonyl-Streckschwingungen; (a)-(c) gemittelte Spektren aus Lutz (1977); (d), (e) eigene Messungen; (a) Monomer in Aceton, Zimmertemperatur, λ_i = 441,6 nm; (b) $(\text{Chl a})_n$ Oligomere, entwässerter fester Niederschlag, T = 35 K, λ_i = 457,9 nm;
(c) $(\text{Chlorophyll a, n} * H_2O)_m$ Polymere, T = 80 K, λ_i = 441,6 nm; (d) Antennen-Chlorophyll a in Süßwasserkieselalge Phaeodaet tricornutum, ganze Zellen, T = 80 K, λ_i = 441,6 nm; (e) Antennen-Chlorophyll a in Salzwasserkieselalge Gomphonema Parvulum, ganze Zellen T = 80 K, λ_i = 441,6 nm, spektrale Auflösung ± 10 cm^{-1}.

Keton – Streckschwingung um 1600 cm^{-1}. Hier zeigt das Chlorella – RR – Spektrum eine breite Bande bei 1626 cm^{-1} während in den *Kieselalgen* – Spektren (Abb. 6.6b,c) an dieser Stelle eine schmälere Linie um 1610 cm^{-1} beobachtet wird. Lutz (1977) konnte zeigen, daß bei Chloroplasten grüner Pflanzen die Verbreiterung dieser Linie durch den Beitrag der Carbonyl – Schwingung des Chl b hervorgerufen wird.

Vergleicht man das mit 441,6 nm registrierte Chl a Spektrum von Chloroplasten einer Chl b freien Mutante (Lutz 1977) mit den Spektren in Abb. 6.6 so fällt die gute Übereinstimmung mit den *Diatomeen* – RR – Spektren im Bereich 1500 – 1650 cm^{-1} auf. Letztere weisen im fraglichen Frequenzbereich eine wesentlich geringere Abweichung der Linienlagen gegenüber dem Chl a *in vitro* Spektrum auf als Abb. 6.6a.

Darüberhinaus zeigt ein Vergleich (Abb. 6.8) mit den RR – Spektren von Chl a Oligomeren und Polymeren im Bereich der aggregat – sensitiven C = O Schwingungen um 1620 cm^{-1} (Lutz 1977) , daß die Antennen – Chlorophylle a der *Kieselalgen* auch in monomerer Form an die Membran oder an Proteine gebunden vorliegen. Oligomere und Polymere weisen eine Raman – Linie bei 1645 cm^{-1} auf. Eine entsprechende Linie ist *in vivo* nicht feststellbar (Abb. 6.8).

Die Verbreiterung der Linien um 1360 cm^{-1} in den RR – Spektren der *Diatomeen* gegenüber dem *Chlorella* – Spektrum (Abb. 6.6) kann als Hinweis auf einen Beitrag des Hilfspigments Chl c gedeutet werden, welches in *Diatomeen* anstelle des Chl b der grünen Pflanzen vorkommt. In Abb. 5.3 wurde die stärkste Linie des Chl c bei 1361 cm^{-1} gefunden und der totalsymmetrischen Atmungsschwingung ν_4 (A_{1g}) zugeordnet. Unterschiede in den Raman – Frequenzen der Süßwasser – *Kieselalge Phaeodactylum tricornutum* (Abb.6.6b) und der Meerwasseralge *Gomphonema parvulum* (Abb. 6.6c) konnten im Rahmen der Meßgenauigkeit (±3 cm^{-1}) nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zur Situation bei *Grünalgen* und grünen Pflanzen (Abb. 6.4.) bietet die Absorptionsspektroskopie selbst bei Übergang zu Tieftemperaturmessungen nur begrenzte Möglichkeiten einer *in vivo* Beobachtung von Chl c in *Kieselalgen*. Das Pigment ist in Abb. 6.7 nur an schwachen Schultern bei 633, 583 bzw. 460 nm zu erkennen. Mit Hilfe der RR – Spektroskopie lassen sich jedoch bei Einstrahlung mit 457,9 nm RR – Linien des Chl c *in vivo* registrieren, wie in Abb. 6.9 zu sehen. Es handelt sich hier um dieselben Proben wie in Abb. 6.6b,c. Sehr deutlich ragt die ν_4 – Mode bei 1361 cm^{-1} heraus. Im

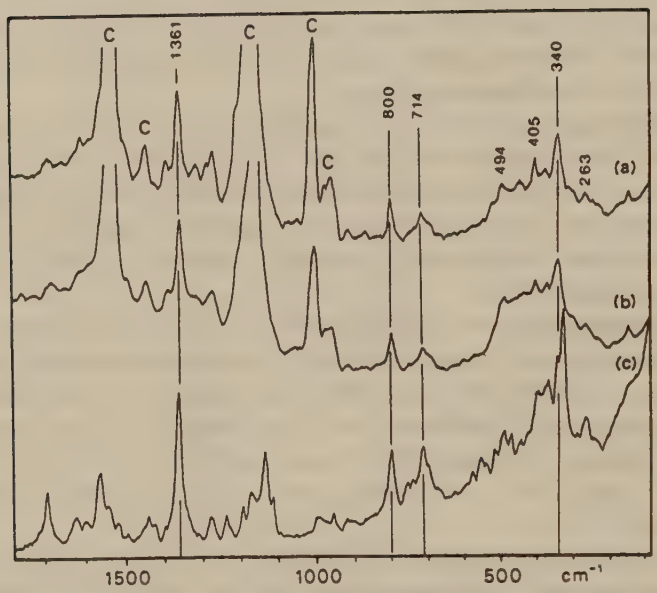


Abb. 6.9.: Resonanz-Raman-Spektren von Chlorophyll c in vivo und in vitro, T = 80 K, spektrale Auflösung 10 cm^{-1}; (a) Süßwasserkieselalge Phaeodactylum tricornutum, ganze Zellen; (b) Salzwasserkieselalge Gomphonema parvulum, ganze Zellen; (c) Chl c_1 + Chl c_2, ($c_1 : c_2$ = 2:1) monomer in Aceton, totale Konz. = $8*10^{-4}$ Mol/l; Carotinoid-Linien sind durch C markiert; die Chl c Zusammensetzung der Algen in (a) und (b) ist etwa $c_1 : c_2 \approx 1:2$ nach Jeffrey (1969).

Bereich der Mg – sensitiven Raman – Frequenzen dominiert eine etwas verbreiterte Bande bei 340 cm^{-1}. Die entsprechende *in vitro* Linie liegt bei 335 cm^{-1} ν_8 (A_{1g}) mit einer Schulter bei 351 cm^{-1}. An dieser Stelle könnte die unterschiedliche Zusammensetzung des Chl c *in vitro* (Chl c_1:Chl c_2 = 2:1) und *in vivo* (Chl c_1:Chl c_2 = 1:2 nach Jeffrey (1969)) zum Ausdruck kommen. Dafür spricht die Tatsache, daß die Linie bei 405 cm^{-1} (ν_{34} + ν_{35} (A_{1g})) in beiden *in vivo* RR – Spektren eine größere Intensität aufweist als im *in vitro* Spektrum (Abb. 6.9c). Durch Untersuchungen an FePP (Desbois et al. 1984a) konnte gezeigt werden, daß die homologe Linie Bewegungen des Zentralatoms einschließt und an Intensität zunimmt, wenn die Positionen 2 und 4 (Abb. 2.7) anstelle von Äthylgruppen Vinylreste tragen. Andererseits muß auch ein unterschiedlicher Koordinationszustand des Mg – Atoms, einmal in acetonischer Lösung und das andere Mal gebunden an die Membran, in Betracht gezogen werden. Weitere Arbeiten hierzu an isolierten Chl c Komponenten in unterschiedlichen molekularen Umgebungen erscheinen erfolgversprechend, um auch für *Diatomeen* die Bindung des Hilfspigments an den Thylakoiden näher einzugrenzen.

Im Bereich der Linien ν_6 (800 cm^{-1}) und ν_7 (714 cm^{-1}) überlagern sich die RR – Frequenzen von Chl a und Chl c. Der Beitrag des Chl a zu den Spektren in Abb. 6.9 kann anhand einer schwachen Linie bei 918 cm^{-1} abgeschätzt werden, welche eindeutig Chl a zuzuordnen ist. Die Bande ist bei *Phaeodactylum* stärker als bei *Gomphonema*, was auf ein etwas kleineres Chl a/Chl c Verhältnis in den untersuchten *Gomphonema* – Zellen schließen läßt. Aus dem Intensitätsvergleich der Linien 918 cm^{-1} und 801 cm^{-1} in den verschieden angeregten *Kieselalgen* – Spektren der Abb. 6.6a und Abb. 6.9a ergibt sich ein Chl a Beitrag zu dem mit 457,9 nm registrierten Chl c Spektrum von *Phaeodactylum* (Abb. 6.9a) kleiner 20 %.

Ein Einfluß des Chl a auf die Struktur des Liniengruppe um 320 cm^{-1} kann auch ausgeschlossen werden. Beim Wechsel der Erregerwellenlänge nach 465,8 nm nimmt die Resonanzverstärkung für Chl a drastisch ab. In derart aufgezeichneten RR – Spektren von *Diatomeen* konnte gegenüber den Spektren in Abb. 6.9 keine wesentliche Änderung der relativen Linienintensitäten der Mg – sensitiven Banden um 320 cm^{-1} beobachtet werden.

Tab. 6.2.: Raman-Frequenzen (cm^{-1}) der Chlorophylle in ganzen Zellen von Phaeodactylum und in acetonischer Lösung bei 80 K.

441.6nm		457.9nm		441.6nm		457.9nm	
Chl a	Phaeodactylum		Chl c	Chl a	Phaeodactylum		Chl c
262m	264w	263vw	266w	--	C	C	1137m
320m	317w	--	--	1148m	C	C	--
--	--	340m	335s	1157sh	C	C	--
352m	352m	--	351msh	--	C	C	1172m
--	--	376w	377m	1187s	1187sh	C	--
392wsh	391vw	--	--	--	C	C	1194w
--	--	405m	401msh	1214sh	C	C	--
435vw	432vw	--	--	--	C	C	1237w
475m	474w	--	472w	1273m	--	C	1276w
--	--	494vw	493w	1294s	1290m	1289m	--
507vw	506vw	--	--	1311sh	C	C	1311vw
--	--	--	514vw	1335m	C	C	--
527w	524vw	522wsh	--	1352s	1354s	--	--
--	--	--	541vw	--	--	1361s	1361s
554vw	551vw	--	555w	1380sh	1380w	--	--
580w	578w	--	578vw	1395m	1392m	1392m	--
605vw	608vw	--	--	--	--	--	1422vw
698m	699w	--	--	1436m	C	C	1437w
--	--	718w	714m	--	--	--	1491vw
725w	723w	--	--	--	--	--	1516vw
--	--	--	741vw	1529m	C	C	--
760w	758vw	--	757vw	--	C	C	1539wsh
801m	801m	802m	800m	1555s	C	C	--
852vw	--	--	--	--	C	C	1561m
920m	918m	919vw	--	1587vw	C	C	--
--	--	--	956vw	--	C	C	1596vw
989m	986m	--	--	1614vw	1610w	--	--
--	C	C	995vw	--	--	--	1622w
1047m	1050w	1051vw	--	1676w	1672w	--	--
--	C	C	1116w	--	--	1689vw	1692m

C: Überlagerung durch Carotinoid-Frequenzen,
Frequenzangaben ± 3 cm^{-1}.

Auch mit 457,9 nm Anregung werden keine Unterschiede in den Raman-Frequenzen der Salzwasser- und der Süßwasser-*Diatomeen* feststellbar. Jedoch weicht das Chl c/Carotinoid Verhältnis der untersuchten Zellen voneinander ab. Intensitätsvergleiche zwischen der ν_3 Carotin-Linie (1011 cm^{-1}) mit der ν_4 Chl c Bande bei 1361 cm^{-1} in Abb. 6.9 machen deutlich, daß *Gomphonema parvulum* mehr Chl c in Relation zu den Carotinoiden enthält als *Phaeodactylum tricornutum*. Einen Vergleich der RR-Frequenzen der in *Diatomeen* vorkommenden Chlorophylle *in vitro* und *in vivo* zeigt die Tabelle 6.2 am Beispiel der hier untersuchten *Kieselalge Phaeodactylum tricornutum*.

6.3. Untersuchungen zu einem Phasenübergang in lebenden *Chlorella*-Zellen

Etwa zur selben Zeit berichteten Szalontai und Csatorday (1980) und Drissler (1980) über die Beobachtung von Phasenübergängen in lebenden Zellen durch RR-Spektroskopie. Während erstere die Photodegradation von membrangebundenen Carotinoiden bei langer Laserbestrahlung benutzten, um in Zellen der *Cyanobakterien Anacystis nidulans* einen Phasenübergang der Membran bei 297 K nachzuweisen, beobachtete Drissler drastische Intensitätsänderungen von Carotenoid und Chl b RR-Linien beim Aufwärmen von *Chlorella pyrenoidosa*-Zellen bei zwei Sprungtemperaturen, 230 K und 261 K. Nun sind Phasenübergänge in Phospholipid-Doppelmembranen im Temperaturbereich 290-310 K seit längerem bekannt, sie wurden mit verschiedenen Methoden nachgewiesen (Murata et al. 1975, Lippert und Peticolos 1971, Pink et al. 1981). Während Drissler selbst (1980) seine Ergebnisse an *Chlorella* als kollektive strukturelle Änderung aller Membranpigmente interpretierte, sahen Del Giudice et al. (1981) darin einen Hinweis auf die Existenz von Solitonen in der PS-Membran. Lutz (1984) gab zu Bedenken, gestützt auf numerische Abschätzungen der Erwärmung im Laserfokus (Lutz 1979), daß die Möglichkeit einer thermischen Zerstörung der Probe dabei in Betracht gezogen werden muß. Das folgende Kapitel widmet sich der Klärung dieser Frage.

6.3.1. Korrektur von Linienzuordnungen im RR – Spektrum von *Chlorella pyrenoidosa* (*fusca*)

Drisslers (1980) *in vivo* RR – Spektren die zur Diskussion eines Phasenübergangs Anlaß gaben, wurden bei 488,0 nm erregt mit einer Intensität von 500 mW. Eine genaue Analyse der RR – Spektren von *Chlorella* bei unterschiedlichen Erregerwellenlängen, und der Vergleich mit den *in vitro* RR – Spektren der zugehörigen Pigmente zeigt jedoch, daß die angegebenen Linienzuordnungen berichtigt werden müssen. Dies ist insofern von Bedeutung, als gerade das Temperaturverhalten einer Linie bei 301 cm^{-1} als Beweis dafür herangezogen wurde, daß Chl b im Vergleich zu den Carotinoiden ein verändertes Verhalten während der Phasenübergänge aufweist, und insbesondere bei Zimmertemperatur nicht beobachtbar ist.

Abb. 6.10 zeigt daher einen Ausschnitt des entsprechenden RR – Spektrums von *Chlorella* und im Vergleich dazu β – Carotin *in vitro*. Es ist leicht zu ersehen, daß die fragliche Chl b Linie des *in vivo* Spektrums (hier bei 297 cm^{-1}) einen Carotin – Beitrag wegen der 295 cm^{-1} Linie in Abb. 6.10b enthalten muß. Aufgrund der hohen Intensitäten der eindeutig auf die Carotinoide zurückzuführenden Banden bei 431 cm^{-1}, 519 cm^{-1} und 873 cm^{-1} (*in vitro* 435,521 und 878 cm^{-1}) in Abb. 6.10a wird klar, daß Carotinoide den Hauptteil an der Intensität dieser Linie tragen müssen. Aus der geringen Höhe der 748 cm^{-1} Chl b – Bande in Abb. 6.10 a folgt außerdem, daß das Chlorophyll bei 488 nm Anregung nur in geringem Ausmaß zum *in vivo* Spektrum beiträgt. Die von Drissler reklamierte Chl b Linie , welche im *in vitro* RR – Spektrum (Abb. 5.2) bei 314 cm^{-1} liegt und annähernd so stark ist wie 748 cm^{-1}, zeigt gegenüber der *in vivo* beobachtbaren Linie (297 cm^{-1} in Abb. 6.10a) eine Verschiebung um immerhin 16 cm^{-1}. Tatsächlich ist sie in Abb. 6.10a an einer schwachen Schulter in der linken Flanke der 297 cm^{-1}

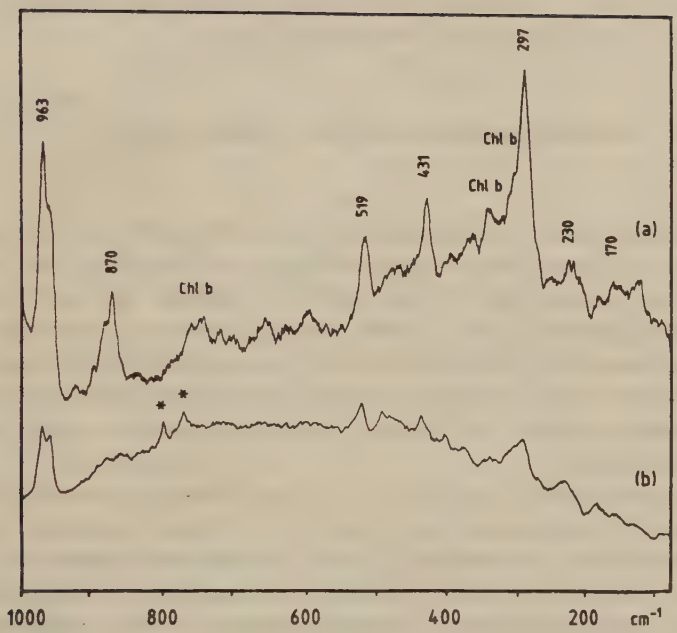


Abb. 6.10.: Resonanz-Raman-Spektren mit 488,0 nm Anregung, Zuordnung von in vivo Carotinoid-Linien; (a) Chlorella pyrenoidosa, ganze Zellen, T = 25 K, I_i = 160 mW, I_{sm} = 4050 cps, ZK = 4 sec; (b) ß-Carotin in Isopentan, Konz. = 1,6 * 10^{-4} Mol/l, T = 87 K, I_i = 100 mW, I_{sm} = 4050 cps, ZK = 4 sec; Chlorophyll b und Isopentan-Linien sind mit Chl b bzw. * gekennzeichnet.

Bande zu erkennen und überragt die nächste Chl b Linie bei 347 cm^{-1} etwas an Intensität.

Letzte Zweifel beseitigt ein vergleichender Blick auf das *in vivo* Spektrum mit 476,5 nm Anregung (Abb. 6.5a). Hier ist ein β – Carotin – Beitrag an einer Schulter bei 298 cm^{-1} zu erkennen, trotz der Dominanz des Chl b. Die Linien 297 cm^{-1} wie auch 431 cm^{-1} in Abb. 6.10a sind also im Gegensatz zu Drisslers (1980) Angaben den Carotinoiden zuzuordnen.

6.3.2. Das Aufwärmverhalten von RR – Intensitäten *in vivo*

Zunächst wurde versucht den beobachteten Effekt unter den von Drissler (1980) angegebenen experimentellen Bedingungen zu realisieren. Dazu wurde eine Zellpaste von *Chlorella fusca* auf 84 K eingefroren und dann langsam (2 K/min) aufgewärmt. Zur möglichst genauen Erfassung der Probentemperatur mußte sichergestellt werden, daß sich der Temperaturfühler (Fe – Constantan Thermoelement) in der Algenpaste befand. Bei den durchgeführten 90^0 – RR-Experimenten (488 nm, bis 500 mW) nach 4.3.1 lag er 0.5 mm vom Streuzentrum entfernt.

Auf diese Weise gelang es den von Drissler (1980) beschriebenen Effekt qualitativ zu reproduzieren (vgl. Abb. 6.11). Danach nehmen die Stokes Linienintensitäten der Carotinoide aus den *Chlorella* RR – Spektren mit steigender Temperatur ab. Bei 178 K schon angedeutet, ganz klar ersichtlich bei 201 K, erscheint ein starker Lumineszenzuntergrund. Darin verschwinden die Linien ab 220 K und tauchen bei 250 K wieder auf. Gleichzeitig mit dem erneuten Auftreten der starken Carotinoid – Linien geht der Lumineszenzuntergrund zurück. Die schwachen Linien im niederfrequenten Bereich um 320 cm^{-1} die in Abb. 6.11 mit 4 – facher Empfindlichkeit registriert wurden, sind nicht mehr erkennbar. Bei 269 K tritt ein ähnlicher Effekt nochmals auf.

Der Temperaturverlauf der Maximumsintensitäten aus Abb. 6.11 ist in Abb. 6.12b wiedergegeben. Darüber zeigt Abb. 6.12a Drisslers Ergebnisse. Um den Vergleich zu erleichtern wurden Normierung und Skalenmaßstäbe gleich gewählt. Charakteristisch für beide Diagramme ist ein starker Intensitätseinbruch, jeweils einhergehend mit dem Auftreten eines Lumineszenzuntergrunds. An dieser Stelle muß darauf hingewiesen werden, daß die Bestimmung

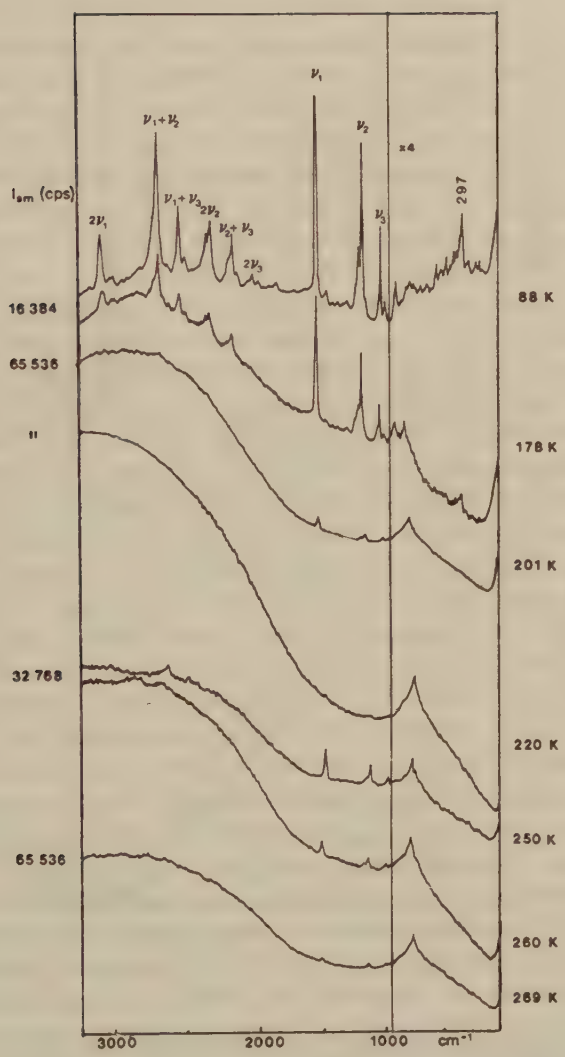


Abb. 6.11.: Temperaturabhängigkeit eines Resonanz-Raman-Spektrums registriert an ganzen Zellen von Chlorella pyrenoidosa (fusca) mit starker 488,0 nm Anregung; I_i = 200 mW; ruhendes Streuzentrum; der Bereich 50 - 950 cm^{-1} wurde mit 4 - facher Empfindlichkeit aufgezeichnet, vgl. Drissler (1980)

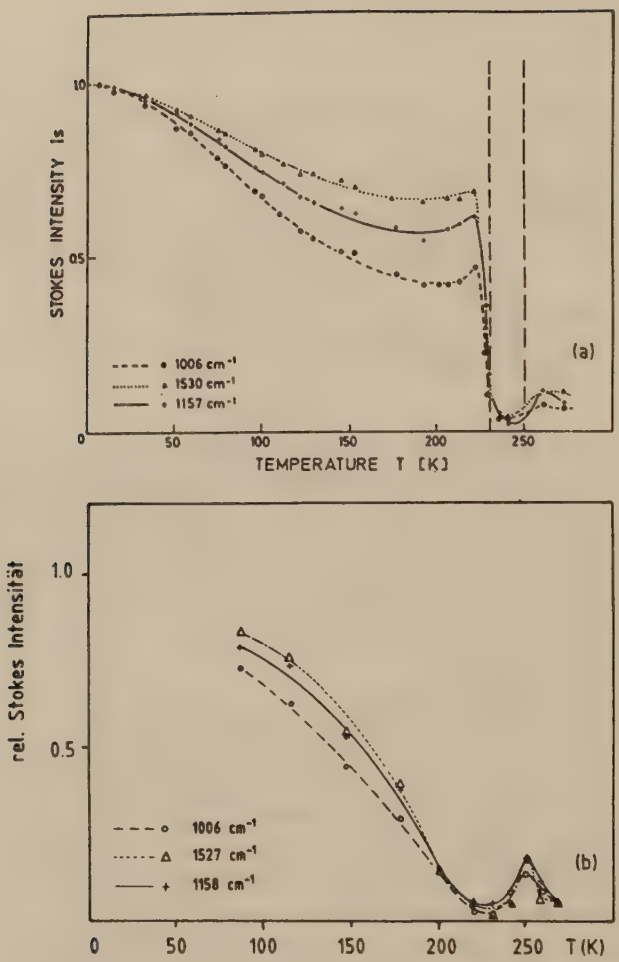


Abb. 6.12.: Temperaturverlauf der Stokes Intensitäten der stärksten Carotinoid-Linien registriert an ganzen Zellen von Chlorella mit starker 488,0 nm Anregung,

a) nach Drissler (1980), Deutung als 'Phasenübergänge' bei 230 K und 261 K, I_i = 500 mW;

b) Auswertung der Messung in Abb. 6.11. zum direkten Vergleich, I_i = 200 mW.

der Linienintensitäten vor einem derart starken Untergrund zu einem großen Fehler führen kann, da das Detektorsystem Photomultiplier und Ratemeter u.U. an der Grenze der zeitlichen Impulsauflösung arbeiten, mithin die gemessenen Zählraten also drastisch unter dem wahren Wert liegen können. Es läßt sich nicht ausschließen, daß der Intensitätsabfall der beobachteten RR – Linien einfach ein Ergebnis des immensen Anstiegs des Lumineszenzhintergrundes ist, zumal die Linien genau dann wieder auftauchen, wenn die Untergrundstrahlung zurückgeht. So tritt die von Drissler (1980) als Phasenübergang interpretierte drastische Intensitätsänderung bei ihm zwischen 230 und 260 K auf. Demgegenüber zeigt Abb. 6.12b eine Verschiebung zu niedrigeren Temperaturen. Außerdem ist der Intensitätsabfall der Carotin – Linien in Abb. 6.12c wesentlich flacher als in Abb. 6.12a. Wie die Meßserie in Abb. 6.11 zeigt, beginnt der Anstieg des Untergrunds in den zugehörigen RR – Spektren schon bei 178 K.

Es konnte durch wiederholte Messungen des Aufwärmverhaltens der RR-Carotin – Linien festgestellt werden, daß der von Drissler beschriebene Effekt nur dann auftrat, wenn Erregerintensitäten > 180 mW eingestrahlt wurden. Außerdem zeigten sich enorme Schwankungen, sowohl den Beginn als auch die Steilheit des Untergrundanstiegs betreffend, auch wenn die Algen in derselben Weise präpariert wurden. Dabei scheint der Wassergehalt der Algenpaste eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß sich die stark absorbierende Probe trotz der Kühlwirkung im Kryostaten durch die Lasereinwirkung im ruhenden Fokus veränderte.

Um den störenden Einfluß des Meßverfahrens auf das Meßobjekt möglichst gering zu halten, wurde die Streulichtoptik so optimiert, daß RR – Spektren befriedigenden Signal/Rausch – Verhältnisses mit 2 mW Erregerintensität aufgezeichnet werden konnten. Eine entsprechende Spektrenserie dazu zeigt die Abb. 6.13. Mit steigender Probentemperatur, gemessen in unmittelbarer Nähe des Streuzentrums, sinkt die Intensität der Carotin – Linien stetig. Eine starke Zunahme des Untergrunds wie in Abb. 6.11 ist hier nicht feststellbar. Lediglich um 260 K ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Die RR – Signale zeigen einen merklichen Intensitätsabfall nach Überschreiten des Gefrierpunkts zwischen 270 K und 280 K. Ein Einfluß dieses Phasenübergangs der wässrigen Bestandteile der Algenzellen auf die Linienintensitäten der Carotinoide ist in jedem Fall zu erwarten. In Abb. 6.14 wurden die Maximalintensitäten für die 4 auch von Drissler (1980) ausgewerteten RR – Linien gegen die Temperatur aufgetragen.

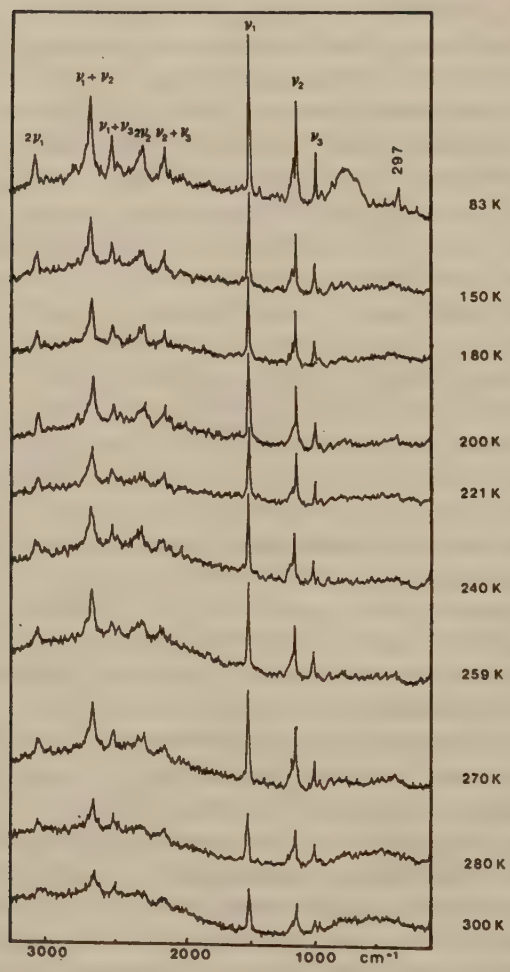


Abb. 6.13.: Temperaturabhängigkeit eines Resonanz-Raman-Spektrums registriert an ganzen Zellen von Chlorella pyrenoidosa (fusca) mit schwacher 488,0 nm Anregung, I_i = 2 mW, I_{sm} = 1000 cps; ruhendes Streuzentrum, der Bereich 50 - 950 cm^{-1} wurde mit 2-facher Empfindlichkeit aufgezeichnet.

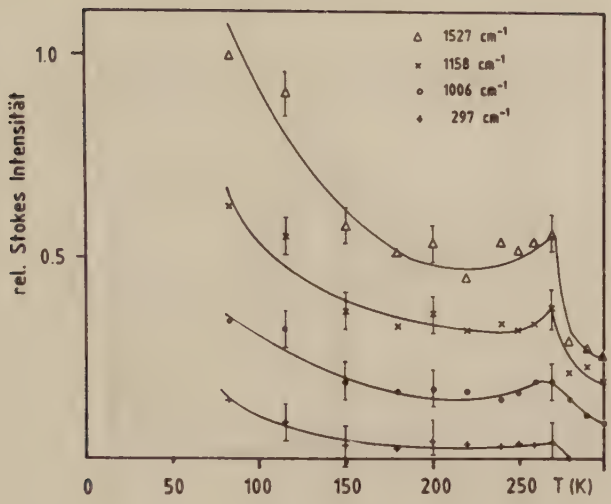


Abb. 6.14.: Temperaturverlauf der Stokes Intensitäten einiger Carotinoid Resonanz-Raman-Linien aus Abb. 6.13, Intensitätswerte relativ zum Maximum der ν_1-Linie bei 83 K.

Die Angabe der Linienhöhe erfolgt dabei relativ zur Intensität der ν_1 – Linie (1527 cm^{-1}) bei 88 K. Trotz der großen Streuung der Meßwerte wegen des kleinen Signal – Rausch Verhältnisses, steht dieser Intensitätsverlauf klar im Widerspruch zu den Ergebnissen in Abb. 6.12. Abgesehen von dem Maximum bei 270 K das bei allen hier ausgewerteten RR – Frequenzen auftritt, kann kein abrupter Intensitätsabfall in der Art der Abb. 6.12 nachgewiesen werden, der auf einen weiteren Phasenübergang hindeuten würde. Die theoretische Beschreibung der Temperaturabhängigkeit von RR – Linien Gleichung (27) gilt in Strenge nur für Gase. Versuche, den Temperaturverlauf von Raman – Intensitäten auch in kondensierter und erstarrter Materie theoretisch zu erfassen stecken noch in den Anfängen.

Abb. 6.15.: Abhängigkeit eines Resonanz-Raman-Spektrums, registriert an ganzen Zellen von Chlorella pyrenoidosa (fusca) von der Erregerintensität I_i; λ_i = 488,0 nm; Probentemperatur thermostatisiert auf 240 K.

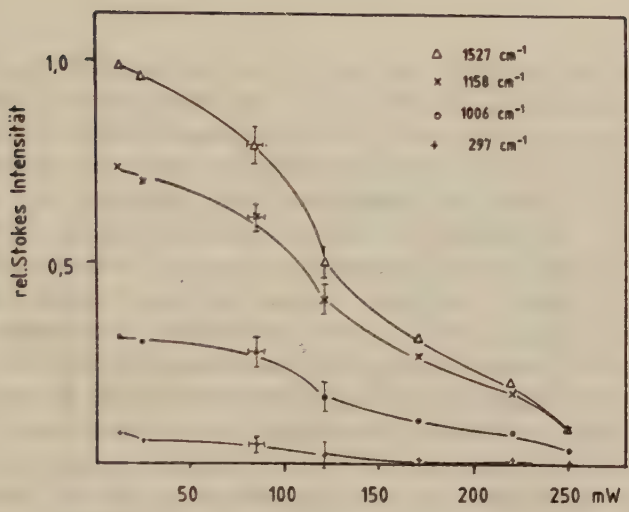


Abb. 6.16.: Abhängigkeit der rel. Carotinoid-Linien Intensitäten der Chlorella Resonanz-Raman-Spektren (Abb. 6.15) von der Erregerintensität, bezogen auf die Maximumintensität der ν_1-Bande bei I_i = 12 mW, λ_i = 488,0 nm.

Drisslers Ergebnisse (Abb. 6.12a) lassen im Hinblick auf Abb. 6.14 auch eine andere Deutung zu. Es muß daran gedacht werden, daß bei hohen Einstrahlungsleistungen (500 mW) das Auftauen der wässrigen Zellbestandteile im Laserfokus bereits bei 230 K einsetzt. Damit kann allerdings der starke Lumineszenzuntergrund noch nicht erklärt werden.

Als nächster Schritt wurde die Abhängigkeit von der Erregerintensität untersucht, wobei eine Probentemperatur von 240 K durch die Regelung des Kryostaten konstant gehalten wurde. Dieser Temperaturwert liegt genau in dem von Drissler (1980) angegebenen Bereich der Phasenänderung. Die übrigen Versuchsparameter stimmten mit den Messungen der Abb. 6.13 überein.

Wie Abb. 6.15 zeigt, läßt sich der Effekt durch Einstrahlung höherer Erregerintensitäten ab 180 mW erzeugen. Die Charakteristik der auftretenden Lumineszenz entspricht genau der in Abb. 4.2 dargestellten spektralen Empfindlichkeit des Detektorsystems, zu identifizieren an dem breiten Maximum bei 729 cm^{-1} in Abb. 6.15, entsprechend einer Wellenlänge von 506 nm (Abb. 4.2). Für die Meßreihe war kein Analysator eingesetzt worden. In Abb. 6.16 wurden die rel. Linienmaxima gegen die Erregerintensität aufgetragen. Zu sehen ist eine stetige Abnahme der Raman – Signale mit unterschiedlichen Steigungen für die verschiedenen Carotinoid – Schwingungen. Nach den Aufwärmmessungen vorgenommene Routinekontrollen unter dem Mikroskop ergaben deutlich erkennbare Oberflächenveränderungen in der Zellpaste immer dann, wenn höhere Erregerintensitäten verwendet worden waren.

Ein weiterer Hinweis auf die Art der Veränderung der Algenzellen ergibt sich aus dem Vergleich der Chl a Fluoreszenz der in Abb. 6.15 untersuchten Probe vor und nach intensiver Anregung. Wie Abb. 6.17 zeigt, erscheint das Fluoreszenzprofil nach der thermischen Belastung durch den Laser (180 mW) verbreitert. Außerdem ist ein zusätzlicher Beitrag um 640 nm zu erkennen. Die starke Bande bei 686 nm läßt sich nach Butler und Kitajima (1975) dem Antennenkomplex Chl a/b zuordnen. Sie entsteht wahrscheinlich durch Excitonenzerfall innerhalb eines, entfernter vom Reaktionszentrum liegenden, Teils dieses Pigment – Proteinkomplexes (Mathis und Paillotin 1981). Genau aus dieser Pigmentgruppe kommen auch die *in vivo* beobachtbaren RR – Signale. Eine Schulter um 640 nm, wie nach der starken Lasereinwirkung feststellbar (Abb. 6.17b), ist jedoch in Fluoreszenzspektren von intakten Algenzellen nicht zu sehen (Butler et al. 1979).

Würde der Excitonentransfer von Chl b auf Chl a in den Antennenkomplexen auf irgendeine Weise unterbrochen, so ist das Auftreten einer Chl b Fluoreszenz zu erwarten. *In vitro* erscheint diese gegenüber der Chl a Fluoreszenz um 19 nm ins Kurzwellige verschoben (Goedheer 1966). Der Nachweis einer neuen Fluoreszenzbande mit einer Verschiebung von – 40 nm gegenüber F – 686 nm (Abb. 6.17) legt diesen Deutungsversuch nahe, auch wenn die Verschiebung größer ist als *in vitro*. Sicher ist jedenfalls, daß die Antennenkomplexe in den Algenzellen durch die intensive Lasereinstrahlung verändert werden.

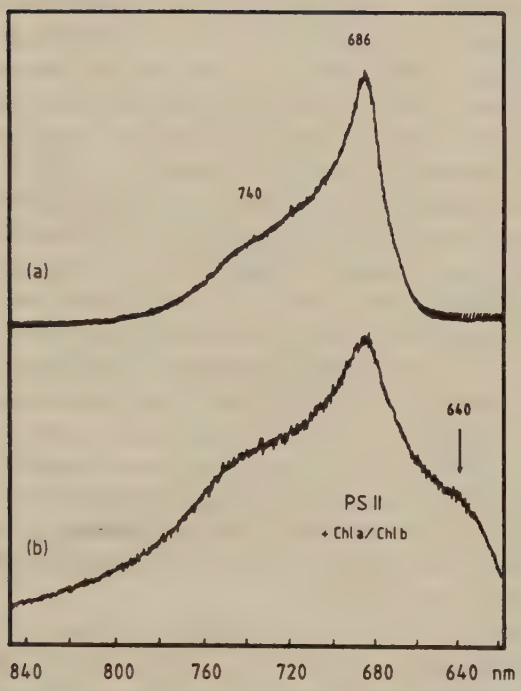


Abb. 6.17.: Vergleich der Fluoreszenzspektren von Chlorella pyrenoidosa Zellen vor (a) und nach (b) intensiver Bestrahlung (488,0 nm, I_i = 220 mW siehe Abb. 6.15) durch den Laser; gleiche Probentemperatur T = 240 K.

6.3.3. RR – Spektren verschiedener *Chlorella* – Farbmutanten

Diese Deutung des Effekts wird zudem durch einen Vergleich der RR-Spektren verschiedener Pigmentmutanten von *Chlorella* unterstützt. Claes (1954) und Schwarze et al.(1960) berichteten über die Herstellung von *Chlorella*-Farbmutanten durch Röntgenbestrahlung und mit Hilfe radioaktiver Isotope. Derart gewonnene mutierte *Chlorella* – Stämme werden in der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen in Form von Erhaltungskulturen konserviert. Von dort können Proben bezogen werden.

Abb. 6.18 zeigt mit 488 nm erregte RR – Spektren des Wildtyps von *Chlorella vulgaris* Stamm 11h (c), einer braunen Chl – Mangelmutante Stamm 8.80 (b) und einer annähernd farblosen Mutante Stamm 15.80 (a) . Das Spektrum des Wildtyps unterscheidet sich nur unwesentlich von dem an *Chlorella pyrenoidosa* registrierten RR – Spektrum (vgl. Abb. 6.10). Zu sehen sind die bekannten starken Carotinoid – Linien und daneben schwache Chl b Linien. Im Vergleich dazu zeigt Abb. 6.18b einen erhöhten Untergrund (Faktor 5) und das charakteristische breite Maximum bei 729 cm^{-1}. Es trat sowohl in Abb. 6.11 als auch in Abb. 6.15 bei hoher Erregerintensität auf und geht eindeutig auf die unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit des Detektorsystems (Abb. 4.2) zurück. Im Übrigen zeigen Drisslers Spektren (1980) eine vergleichbare Bande, woraus zu schließen ist, daß ähnliche holographische Beugungsgitter verwendet wurden.

Der in Abb. 6.18b untersuchte Stamm gehört zu den Chl – Mangelmutanten. Die Zellen erscheinen daher gelblich braun durch die Carotin – Färbung. Entsprechend sind nur Carotinoid RR – Linien erkennbar. Da hier die Absorption des Erregerlichts durch Chlorophylle und der Transfer der Anregungsenergie auf die Reaktionszentren im Vergleich mit dem Wildtyp Abb. 6.18c drastisch vermindert ist, wird ein größerer Teil der eingestrahlten Energie durch spontane Lumineszenz verschiedener Moleküle in den Zellen wieder abgegeben.

Dieser Effekt tritt in Abb. 6.18a noch deutlicher hervor. Hier wurde eine blaßgrüne *Chlorella*-Mutante untersucht, die sowohl einen verringerten Chlorophyll als auch einen reduzierten Carotinoid – Anteil aufweist. Der Untergrund

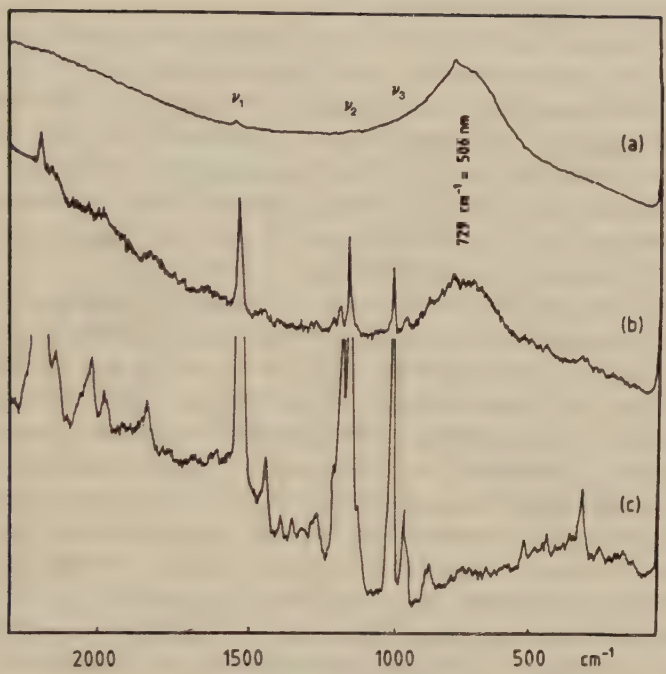


Abb. 6.18.: Resonanz-Raman-Spektren von Chlorella Pigmentmutanten, 488,0 nm Anregung, T = 86 K;

(a) Chlorella vulgaris 15.80, blaßgrün, Pigment- Mangelmutante, I_i = 50 mW, I_{sm} = 65500 cps, ZK = 1 sec;

(b) Chlorella vulgaris 8.80, braun, Chlorophyll- Mangelmutante, I_i = 20 mW, I_{sm} = 4100 cps, ZK = 1 sec;

(c) Chlorella vulgaris 211-11h, dunkelgrün, Wildtyp, I_i = 100 mW, I_{sm} = 2050 cps, ZK = 2 sec;

Bezeichnung der Zellkulturen nach Schlösser (1982).

ist hier 15 – mal so hoch wie in Abb. 6.18c. Lediglich die ν_1 – Linie der Carotinoide ist schwach zu erkennen.

Diese Beobachtungen legen nahe, daß in den Experimenten Abb. 6.11 und Abb. 6.15 ein Teil der Chlorophylle seine Funktion eingebüßt hat.

Als letzter Beitrag zum Temperaturverhalten von RR – Spektren an lebenden *Chlorella* – Zellen soll noch gezeigt werden, daß sehrwohl Chl b RR – Linien nach dem Phasensprung um 270 K bei Zimmertemperatur beobachtbar sind. Außerdem soll einem möglichen Einwand begegnet werden, der Effekt des Phasenübergangs trete möglicherweise nur auf, wenn die Zellen vorher auf nahezu He – Temperaturen abgekühlt wurden.

Dazu wurde eine Probe von *Chlorella pyrenoidosa* im Kryostaten auf 23 K gebracht und anschließend eine Aufwärmserie mit 476 nm Anregung aufgezeichnet. Wie aus Abb. 6.19 zu ersehen, bleiben die in Abb. 6.5 eindeutig identifizierten Chl b RR – Linien 746 cm^{-1} und um 314 cm^{-1} über den gesamten Temperaturbereich beobachtbar. Für die Aufnahme dieser Spektrenserie wurde das in 4.3.3. beschriebene Oberflächenscanning Verfahren verwendet. Aufgrund der thermischen Entlastung der Probe durch den rotierenden Laserfokus, konnte mit einer Erregerintensität von 200 mW eingestrahlt werden ohne die Probe zu verändern. Dies führte zu einer deutlichen Verbesserung des Signal/Rausch – Verhältnisses (vgl. Abb. 6.19 und Abb. 6.13).

Der Intensitätsverlauf einiger Carotinoid – und Chlorphyll – Linien ist in Abb. 6.20 eingetragen und mit dem Ergebnis in Abb. 6.14 vergleichbar. Ein Effekt wie in Abb. 6.12 ist auch hier nicht feststellbar.

Abb. 6.19.: Temperaturabhängigkeit eines Resonanz-Raman-Spektrums registriert an ganzen Zellen von Chlorella pyrenoidosa (fusca), mit 476,5 nm Anregung, rotierende Linse, I_i = 50 mW, I_{sm} = 16400 cps, ZK = 1 sec.

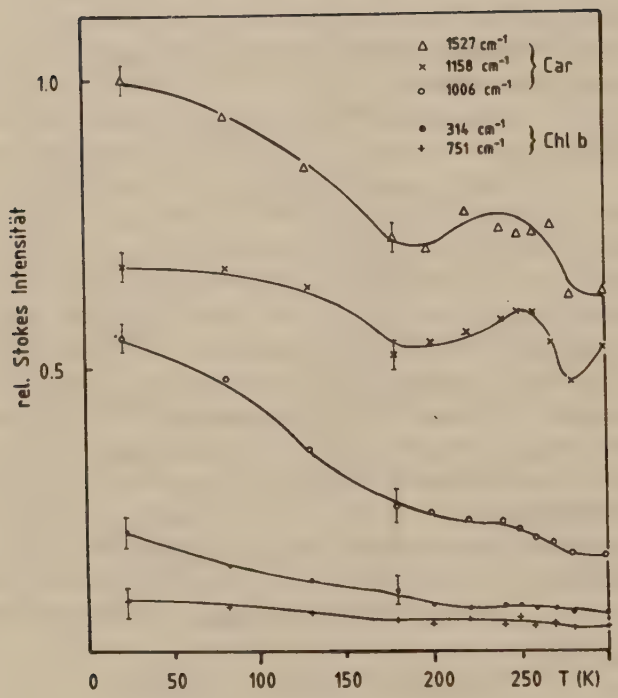


Abb. 6.20.: Temperaturverlauf der Maximumintensitäten einiger Chlorophyll b und Carotinoid Resonanz-Raman-Linien aus Abb. 6.13; Intensitätswerte relativ zur Linienhöhe von ν_1 bei 23 K.

6.3.4. Schlußfolgerungen

Für die abschließende Bewertung des Phasenübergangseffekts als Begleiterscheinung einer Zellschädigung im Laserfokus stehen folgende Argumente zur Verfügung:

- Der Effekt tritt nur in Aufwärmspektren auf, die mit Erregerintensitäten >180 mW registriert werden, wobei der Temperaturbereich des Phasenübergangs je nach Probe starken Schwankungen unterliegt.
- Unter schwacher Lasereinstrahlung (2mW) ergibt sich ein stetiger Temperaturverlauf der Carotinoid – Linienintensitäten mit nur einem deutlichen Phasensprung um 270 K, dem Schmelzpunkt der wäßrigen Probe.
- Bei festgehaltener Probentemperatur 240 K läßt sich die von Drissler (1980) beobachtete Veränderung im RR – Spektrum einfach durch Erhöhen der Erregerintensität auf über 180 mW erzeugen.
- Im Vergleich der Chl a Fluoreszenzen einer Algenprobe vor und nach hoher Belastung im Laserfokus (>180 mW) wird eine Verbreiterung und das Auftreten einer zusätzlichen blauverschobenen Bande (640 nm) bei den bestrahlten Zellen feststellbar.
- Unter dem Mikroskop ist eine Oberflächenveränderung am Ort der Lasereinwirkung nach intensiver Einstrahlung (>180 mW) erkennbar.
- Das Maximum des Lumineszenzuntergrunds bei 507 nm ist zweifelsfrei auf den Verlauf der spektralen Empfindlichkeit des Detektorsytems zurückzuführen.
- *Chlorella*-Farbmutanten zeigen ebenfalls eine Untergrundlumineszenz, deren Stärke von dem Grad des Pigmentausfalls abhängt.
- Bei genügender Probenentlastung, z.B. durch eine geeignete Scanning – Technik, können Chl b Linien im gesamten Temperaturbereich 23 – 300 K beobachtet werden.

7. Registrierung von Raman – Anregungsprofilen (REPs) bei tiefen Temperaturen

Die bisherigen Ausführungen beschäftigten sich im wesentlichen mit der Auswertung der Raman – Frequenzen und mit dem Temperaturverhalten von Linienintensitäten bei jeweils festen Erregerwellenlängen. Damit war es möglich einige neue Aussagen über den Grundzustand der betrachteten Photosynthesepigmente zu treffen. Im folgenden wird nun die Abhängigkeit der Linienintensitäten von der Erregerwellenlänge untersucht. Die daraus gewonnenen sog. Raman – Anregungsprofile (REPs) beinhalten Informationen über den elektronisch angeregten Zustand und zwar detaillierter als es das Absorptionsspektrum zu liefern vermag. Darüber hinaus eröffnet die Registrierung von REPs prinzipiell die Möglichkeit, an Pigmentsystemen, wie sie z.B. photosynthetisierende Organismen darstellen, selektiv die Pigmentabsorptionen zu bestimmen. Dies ist insofern von Interesse, als die Lage der Absorptionsmaxima umgebungsabhängig und somit *in vivo* und *in vitro* in der Regel unterschiedlich ist. Die in Kapitel 2.1.4. hergeleiteten Gleichungen (20,21,22) erlauben die Berechnung von REPs aus dem Absorptionsspektrum und damit einen Vergleich von Theorie und Experiment.

Wegen der vielen apparativen Konstanten sind Messungen absoluter Raman-Streuintensitäten und deren Abhängigkeit von der Erregerwellenlänge kaum zu realisieren. So werden üblicherweise bei *in vitro* Experimenten (Tasumi et al. 1973, Champion und Albrecht 1979) die stärksten Raman – Linien des Lösungsmittels als interne nichtresonante Intensitätsreferenz herangezogen. Allerdings darf dann die Pigmentkonzentration nicht zu hoch gewählt werden, da sonst u. U. die Lösungsmittellinien im RR – Spektrum des Farbstoffs verschwinden.

Im Fall biologischer Proben, wie den hier untersuchten Algenzellen, erscheint es kaum möglich, mit einem internen nichtresonanten Intensitätsstandard zu arbeiten. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zum einen lassen sich lebende Zellen nicht beliebig in ein als Intensitätsreferenz geeignetes Lösungsmittel bringen oder mit einer bestimmten Molekülart anreichern, ohne dadurch verändert zu werden. Zum anderen darf eine Referenzlinie nicht von anderen resonanten oder nichtresonanten Raman – Linien im Spektrum überdeckt sein.

Bei der Vielzahl der in lebenden Zellen vorhandenen Moleküle ließe sich diese Bedingung wohl schwerlich erfüllen. Außerdem ist eine hohe Pigmentkonzentration und damit Algenkonzentration notwendig um auswertbare RR – Spektren der Chlorophylle *in vivo* zu erhalten, wobei wie in Kapitel 6.3 gezeigt wurde, unbedingt zu tiefen Probentemperaturen übergegangen werden muß.

In 4.3.3. wurde bereits darauf hingewiesen, daß die verwendete Zweikanal – Oberflächenscanning – Technik eine Möglichkeit bietet, bei tiefen Temperaturen REPs gegen eine nichtresonante Referenz zu registrieren. Probe und Referenz werden dabei unabhängig voneinander in je eine Hälfte der geteilten Küvette eingebracht und wegen der Rotation der Linse L_2 (Abb. 4.4.) abwechselnd gemessen. Die Referenz kann nun passend zum RR – Spektrum des Pigments gewählt werden, und Probleme des Überdeckens von Raman – Linien fallen wegen der Zweikanalregistrierung weg. Abb. 7.1. demonstriert dies am Beispiel von *Chlorella fusca* mit Aceton als Referenz, registriert bei 84 K.

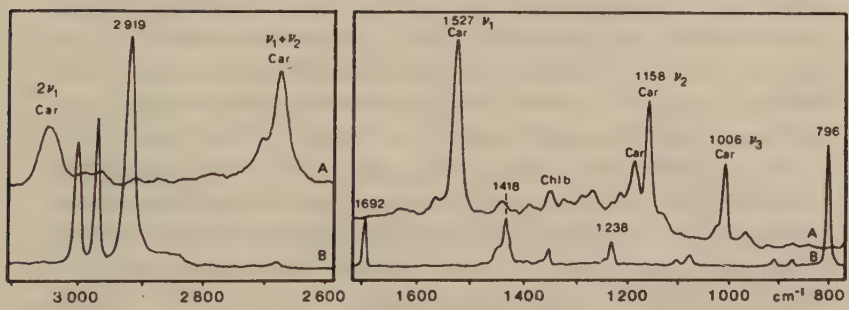


Abb. 7.1.: Zweikanalregistrierung von Raman-Spektren mit 476,5 nm Anregung zur Bestimmung von REPs, T = 84 K, I = 150 mW, spektrale Auflösung ± 10 cm^{-1},

(A) Chlorella fusca, ganze Zellen, resonante Streuung, Grund- und Obertonregion der Carotinoide, I_{sm} = 32000 cps,

(B) Aceton, gewöhnliche Raman-Streuung, I_{sm} = 16000 cps; ausgewertete Linien tragen Frequenzangaben.

7.1. Kontrollmessungen zur Zweikanalregistrierung mit Intensitäts-referenz

Vor und nach jeder Meßreihe von REPs wurden Eichmessungen durchgeführt, um sowohl systematische Abweichungen der Apparatur zu erfassen als auch justierungsbedingte Intensitätsschwankungen abzuschätzen. Dazu befand sich in beiden Kammern der Tieftemperaturküvette Aceton. Das Lösungsmittel zeigt mit Anregung im sichtbaren Spektralbereich gewöhnliche Raman-Streuung. Aufgrund der Lage seiner Raman-Frequenzen eignet es sich gut als nichtresonante Referenz für REP-Messungen an organischen Farbstoffen (vgl. Abb. 7.1.).

Abb. 7.2. zeigt die Auswertung einer entsprechenden Meßreihe, die mit allen verfügbaren Erregerfrequenzen des Ar^+-und des He-Cd Lasers aufgezeichnet wurde. Dabei sind die Registrierbedingungen der zugrundeliegenden Raman-Spektren mit den Einstellungen für die nachfolgend gezeichneten REP-Serien (Abb. 7.4) identisch. Wie aus Abb. 7.2 hervorgeht, beträgt die Abweichung des Intensitätsquotienten der Kanäle A und B vom Mittelwert maximal 15 % für alle ausgewerteten Raman-Frequenzen. Dieser Wert beinhaltet alle statistischen und systematischen Fehler welche bei der Bestimmung der REPs auftreten, mit Ausnahme der Absorptionseinflüsse durch das Pigment selbst (vgl. Kap. 7.2). Justierungsbedingte systematische Abweichungen, welche alle Raman-Frequenzen gleich betreffen, sind in Abb. 7.2. nicht feststellbar.

An dieser Stelle muß erwähnt werden, daß sich die Meßgenauigkeit durch Verwenden kleinerer Registriergeschwindigkeiten und höherer Zeitkonstanten durchaus steigern ließe. Bei dem gegenwärtigen Stand der Raman-Apparatur ist dies jedoch wegen der enorm langen Meßdauer nicht durchführbar. Dazu müßte die Apparatur automatisiert werden, oder besser, ein OMA-System (optical multichannel analyzer) eingesetzt werden.

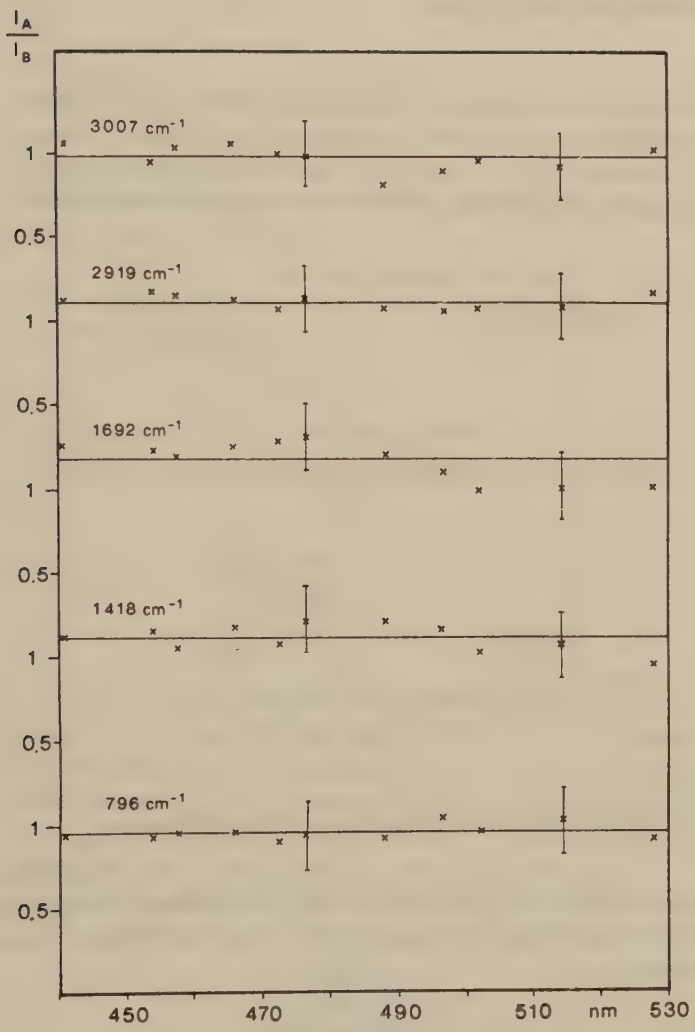


Abb. 7.2.: Kontrollmessungen zur Bestimmung von REPs bei 84 K mittels Zweikanal-Scanning-Technik; Erläuterungen siehe Text.

7.2. Korrektur der Reabsorption

Zur Bestimmung der Raman – Anregungsprofile (REPs) von Pigmentlinien aus einer Spektrenserie ähnlich Abb. 7.1 muß noch der Einfluß der Pigmentabsorption sowohl auf das Erregerlicht I_0 als auch auf das frequenzverschobene Streulicht I_s berücksichtigt werden. Für 180^0 – Streuung läßt sich dazu ein

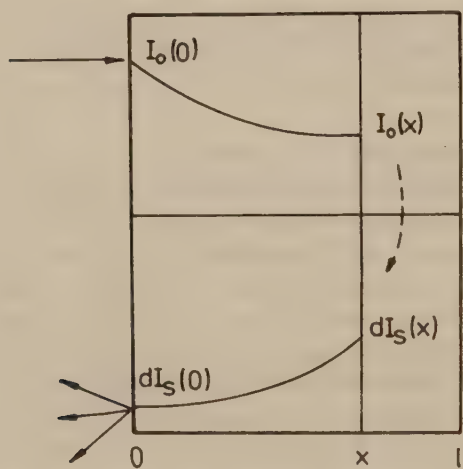


Abb. 7.3.: Zur Korrektur der Reabsorption bei Rückwärtsstreuung

eindimensionales Modell heranziehen (Abb. 7.3). Das einfallende Erregerlicht wird in einer Pigmentlösung der Konzentration c nach dem Lambert – Beer Gesetz geschwächt.

$$I_0(x) = I_0(0)e^{-\ln 10(\mu(\omega_0)cx)} \tag{32}$$

Die in dem Volumen $(d\sigma/d\Omega)dx$ erzeugte und in den Raumwinkel $d\Omega$ rück-

gestreute Raman – Intensität $dI_s(x)$

$$(33) \qquad dI_s(x) = I_0(x) \frac{d\sigma}{d\Omega} c \, dx$$

wird innerhalb der Probe ebenfalls geschwächt und fällt bis zum Austritt aus der Probenoberfläche (Abb. 7.3) ab auf

$$(34) \qquad dI_s(0) = dI_s(x) e^{-\ln 10 \, (\mu(\omega_0-\omega_a)cx)} .$$

Integration von dI_s über die gesamte Probentiefe ergibt die, unter einem bestimmten Öffnungswinkel beobachtbare Raman – Streuintensität

$$(35) \qquad I_s = \frac{I_0 \sigma c \left(1-e^{-\ln 10 \, (\mu(\omega_0)+\mu(\omega_0-\omega_a))cl}\right)}{\ln 10 \, (\mu(\omega_0)+\mu(\omega_0-\omega_a))c} ,$$

wobei hier mit σ der wirksame Streuquerschnitt des Experiments eingeführt wurde. Im Fall hoher Pigmentkonzentration ist der Exponentialterm in Gleichung (35) klein gegen 1 und kann vernachlässigt werden. Diese Voraussetzung ist für Resonanz – Raman – Messungen an photosynthetisierenden Zellen erfüllt. Hier treten typische Absorptionslängen von 10 – 20 µm auf. Daher gilt für die Streuintensität der j – ten Raman – Linie des p – ten Pigments

$$(36) \qquad I_{spj} = \frac{I_0 \sigma_{pj} c_p}{a(\omega_0)+a(\omega_0-\omega_{pj})} ,$$

mit der Gesamtabsorption $a(\omega)$, vgl. auch Batchelder und Bloor (1984). $a(\omega)$ konnte mittels eines Spektralphotometers auch bei tiefen Temperaturen bestimmt werden.

7.3. REPs von β – Carotin *in vitro*

Zu Beginn der REP – Messungen sollte mit einem Pigment gearbeitet werden, dessen REPs bereits bekannt sind, um die Zuverlässigkeit des Meß – und Auswerteverfahrens zu überprüfen. Dazu bot sich β – Carotin an, einmal, da bereits mehrere einschlägige Arbeiten vorliegen (Inagaki et al. 1974, Sufra et al. 1977, Ho et al. 1982), und zum anderern, da es in den *in vivo* RR – Spektren am stärksten hervortritt (Abb. 6.3).

Das Pigment wurde in Isopentan gelöst und bei 125 K im Kryostaten thermostatisiert. Für die Raman – Messungen wurde die Zweikanal – Oberflächenscanning – Technik (Abb. 4.4) eingesetzt, wobei reines Isopentan in der zweiten Küvettenhälfte als Intensitätsreferenz diente. Das RR – Spektrum von β – Carotin wurde jeweils mit 11 verschiedenen Erregerwellenlängen im Bereich 441.6 – 528.7 nm registriert. Das Ergebnis einer typischen Meßreihe ist durch die Punkte in Abb. 7.4. wiedergegeben. Ausgewertet wurden jeweils die Spitzenintensitäten der drei starken Grundschwingungen ν_1, ν_2 und ν_3 sowie der Obertöne $2\nu_1$ und $\nu_1 + \nu_2$. Zum Vergleich ist im oberen Teil das ebenfalls bei 128 K registrierte Absorptionsspekrum derselben Probe abgebildet. Es wird einerseits zur Korrektur der Reabsorption nach (36) benötigt. Andererseits dient es zur Berechnung der Raman – Anregungsprofile nach den Gleichungen (20,21,22).

Die Rechnungen wurden von dem Fortranprogramm TREPS (siehe Anhang A) am Leibnitz Rechenzentrum ausgeführt. Im Fall des Obertons $2\nu_1$ wurde Gleichung (20) durch

$$(37) \qquad A_{0,2}(\omega_0) = \frac{M_a}{\sqrt{2}} \left(A_{0,0}(\omega_0) - 2A_{0,0}(\omega_0-\omega_a) + A_{0,0}(\omega_0-2\omega_a)\right)$$

und für die Kombinationsbande $\nu_1 + \nu_2$ durch

$$(38) \qquad A_{0,0';1,1'}(\omega_0) = M_a M_a' \left(A_{0,0}(\omega_0) - A_{0,0}(\omega_0-\omega_a) - A_{0,0}(\omega_0-\omega_a') - A_{0,0}(\omega_0-\omega_a-\omega_a')\right)$$

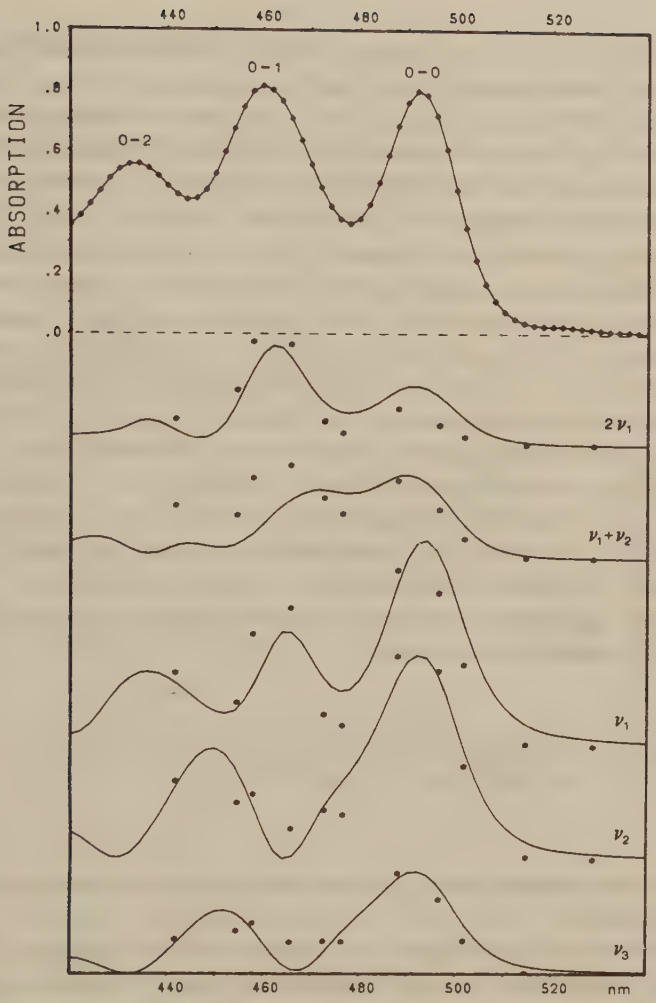


Abb. 7.4.: oberer Teil: Absorptionsspekrum von ß-Carotin in Isopentan, T = 128 K

unterer Teil: REPs von ß-Carotin Schwingungen; die durchgezogenen Linien wurden aus dem Absorptionsspektrum berechnet; experimentell ermittelte Werte aus RR-Spektren ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l, T = 125 K) sind als Sterne eingetragen.

ersetzt (Hassing und Sonnich Mortensen 1980). Die auf diese Weise berechneten REPs (durchgezogene Linien) lassen sich nun mit den experimentell bestimmten REP-Werten direkt vergleichen. Die Übereinstimmung ist offensichtlich recht gut. Größere Abweichungen treten nur im Anregungsprofil der Kombinationsbande auf. Alle REPs zeigen ein Maximum um 492 nm, dem rein elektronischen Übergang 0 – 0. Es ist für den Oberton $2\nu_1$ relativ schwächer ausgeprägt. Während die Grundtöne ν_2 und ν_3 nur einen unwesentlichen Beitrag ihres ersten schwingungsangeregten Übergangs 0 – 1 aufweisen, zeigen sowohl Grundschwingungen als auch erste Oberschwingungen der ν_1 – Bande an dieser Stelle ein deutliches Maximum in ihren REPs um 460 nm. Der konträre Intensitätsverlauf des ν_1 und des $2\nu_1$ REPs bezüglich des 0 – 0 und des 0 – 1 Übergangs wird übereinstimmend durch die Theorie und durch das Experiment belegt und ist Ausdruck des großen Anteils der C = C Schwingung an der 0 – 1 Aufspaltung im Absorptionsspektrum. Die 0 – 2 Übergänge der ν_2 und der ν_3 Bande treten in den REPs wesentlich stärker hervor als die jeweiligen 0 – 1 Übergänge. In Übereinstimmung damit sinkt die Absorption bei 446 nm nicht soweit ab, wie im Minimum zwischen den 0 – 0 und 0 – 1 Maxima.

Bei der numerischen Berechnung des Hauptwertintegrals in Gleichung (21) wurde der Integrand zunächst zerlegt,

$$\frac{\sigma_a(\omega)}{\omega^2-\omega_0^2} = \frac{\sigma_a(\omega)}{2\omega_0}\left(\frac{1}{\omega-\omega_0} - \frac{1}{\omega+\omega_0}\right) \tag{39}$$

und dann die Integration von beiden Seiten gleich nahe an die Polstelle ω_0 heran ausgeführt.

Als Facit der Testmessungen an β – Carotin *in vitro* (Abb. 7.4) kann festgestellt werden, daß die mittels Zweikanal – Scanning Verfahren und außerhalb liegender Referenz erzielten Ergebnisse mit früheren (Inagaki et al. 1974, Ho et al. 1982) vergleichbar sind, die mit interner Intensitätsreferenz erzielt wurden. Damit erweist sich das hier beschriebene Verfahren als geeignet, REP – Messungen auch *in vivo* gegen eine nichtresonante Referenz durchzuführen.

7.4. REPs von Algenpigmenten *in vivo*

Beispiele für Zweikanal - RR - Spektren, aus denen die Linienintensitäten zur Bestimmung von REPs *in vivo* entnommen wurden, zeigen Abb. 7.1 und Abb. 7.5 für *Chlorella fusca*. Als Referenz diente reines Aceton. Die ausge -

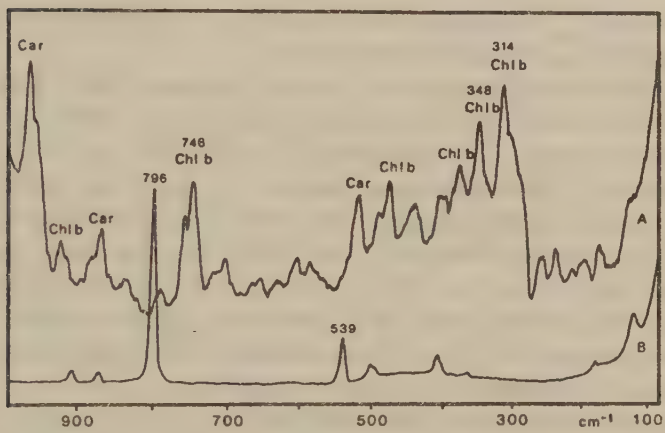


Abb. 7.5.: Zweikanalregistrierung von Raman-Spektren mit 476,5 nm Anregung zur Bestimmung von REPs, T = 84 K, spektrale Auflösung ± 10 cm^{-1}, I = 150 mW (A) Chlorella fusca, ganze Zellen, resonante Streuung an Chlorophyll b (Chl b), I_{sm} = 8000 cps, Carotinoid-Beiträge sind mit Car bezeichnet. (B) Aceton, gewöhnliche Raman-Streuung, I_{sm} = 16000 cps; ausgewertete Linien tragen Frequenzangaben.

werteten Pigment und Referenzlinien sind jeweils mit Wellenzahlangaben versehen. Wegen der hohen Absorption der Algenzellen kann die Reabsorption wieder in der Form (36) berücksichtigt werden, wobei $a(\omega_0)$ jetzt durch das *in vivo* Absorptionsspektrum bei tiefer Temperatur dargestellt wird. Für das REP Φ_{pj} einer Pigment (p) Raman – Linie (j) gilt dann nach (1) und (36)

$$(40) \qquad \Phi_{pj}(\omega_0) \approx \frac{I_{pj}}{I_R} \left(\frac{\omega_0-\omega_R}{\omega_0-\omega_{pj}}\right)^4 \left(a(\omega_0)+a(\omega_0-\omega_{pj})\right)$$

mit den Pigment I_{pj} und Referenzlinienintensitäten I_R aus 11 verschiedenen mit ω_0 angeregten Raman – Spektren ähnlich Abb. 7.5.

Die so bestimmten Anregungsprofile (Wagner 1986) sind in Abb. 7.6 eingetragen. Darüber befindet sich ein Ausschnitt des zugehörigen Tieftemperaturabsorptionsspektrums in zwei Ausführungen. Das Spektrum (a) wurde bei 110 K mit dem PU 8800 Spektrometer registriert. (b) wurde einer Arbeit von Cho und Govindjee (1970) entnommen. Die Autoren verwendeten ein spezielles Verfahren um Fluoreszenzeffekte im Absorptionsspektrum einer dünnen Algenschicht von *Chlorella fusca* bei 77 K zu eliminieren. Auf diese Weise konnten sie drei schwache Maxima bei 464, 476.5 und 491 nm auflösen, welche sie den Pigmenten Chlorophyll b und β – Carotin zuordneten. Eine Wiederholung dieser Messung bei 4 K brachte keine weitere Verbesserung.

Für die Darstellung der Grundton – REPs der Carotinoide ν_1 ,ν_2 und ν_3 in Abb. 7.6 wurde jeweils derselbe Ordinatenmaßstab verwendet. Die Profile der Obertöne ($2\nu_1$, $\nu_1 + \nu_2$) und der Chl b Linien wurden mit einem Faktor 4 bzw 20 versehen. Analog den Ergebnissen an reinem β – Carotin (Abb. 7.4), ist ein gemeinsames Maximum der Carotinoid – REPs feststellbar. Es entspricht auch *in vivo* dem 0 – 0 Übergang, erscheint jedoch langwellig verschoben bei 496 nm. Goedheer (1969) fand bei seiner Arbeit mit einer Chl b – freien Mutante von *Chlorella*, aus der er die Carotinoide extrahierte, zwei Banden bei 465 und 495 nm im Differenzabsorptionsspektrum, die er den Carotinoiden zuordnete. Der 0 – 1 Übergang der Carotinoide des *in vivo* Absorptionsspektrums (464 nm) tritt als zweites schwaches Maximum im Anregungsprofil der ν_1 – Bande auf. Demgegenüber ist das Anregungsmaximum der $2\nu_1$ – Linie zu kürzeren Wellenlängen verschoben und liegt bei 458 nm.

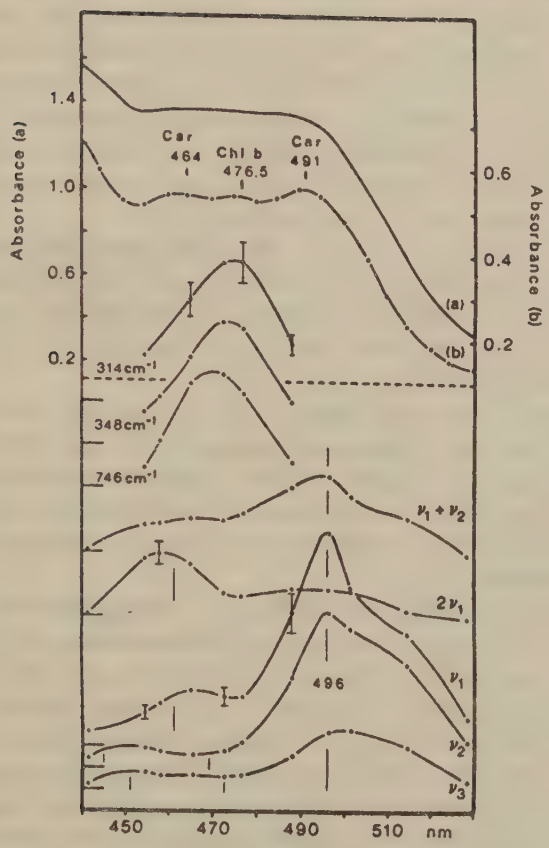


Abb. 7.6.: oberer Teil: (a) Absorptionsspektrum von Chlorella fusca registriert bei 110 K mit einem PU 8800 Spektrophotometer
(b) Absorptionsspektrum von Chlorella fusca bei 77 K, Einfluß der Fluoreszenz eliminiert nach Cho und Govindjee (1970)
unterer Teil: REPs von Chl b- und Carotinoid-Linien aus RR-Spektren von Chlorella fusca bei 84 K. Die Wellenlängen der 0-0,0-1 und höherer Progressionen der verschiedenen Carotinoid-Moden sind durch senkrechte Striche gekennzeichnet.

Im Vergleich mit den Anregungsprofilen von β – Carotin *in vitro* (Abb. 7.4) fallen die breiten Schultern bei 514 nm in Abb. 7.6 auf. Sie sind auf die Anwesenheit zusätzlicher Carotinoide wie Lutein im Chloroplasten zurückzuführen, oder auf β – Carotin – Moleküle, die sich durch die Bindung an die Antennenkomplexe unterscheiden. Auch Strukturisomere kommen hier in Frage. Dafür spricht außerdem, daß im RR – Spektrum von *Chlorella* neue schwächere Linien im Bereich 1100 – 1500 cm^{-1} auftreten, wenn an Stelle von 496.5 nm eine Erregerwellenlänge von 514.5 nm eingestrahlt wird.

Von den *in vivo* beobachtbaren Chl b RR – Linien eignen sich nicht alle für die Auswertung der reinen Anregungsprofile, da ein Teil von den starken Carotinoid – Linien im Bereich 960 – 1530 cm^{-1} überlagert ist. Ohne Carotin – Beiträge sind die Doppellinien bei 746 cm^{-1} und einige der Mg – sensitiven Linien um 320 cm^{-1} (Abb. 7.5).

Die drei ausgewerteten Chl b REPs in Abb. 7.6. bestätigen die Zuordnung im Absorptionsspektrum. Während die Maxima für 314 und 348 cm^{-1} bei 474 nm liegen, weist das Profil der 746 cm^{-1} Linie eine Verbreiterung und eine Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen auf. Dies könnte ein Hinweis auf den von Stallard et al.(1984) diskutierten Franck – Condon – Beitrag bei Soret-angeregten Porphyrinen sein.

Für eine genauere Analyse dieser Effekte *in vivo* wie auch der Untersuchung der Carotinoid – REPs um 510 nm ist jedoch eine größere Anzahl von Meßpunkten unbedingt erforderlich. Dies ist nur durch den Einsatz eines leistungsfähigen Farbstofflaser – Systems realisierbar. Leider standen derartige experimentelle Möglichkeiten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung. Als Ergebnis der in Abb. 7.6 dargestellten Kurvenverläufe bleibt festzuhalten, daß die Auswerung von REPs zusammen mit dem Absorptionsspektrum prinzipiell gestattet, die Pigmentabsorptionen *in vivo* selektiv zu ermitteln. Dazu müssen für jedes Pigment Rechnungen nach Kap. 7.3 ausgeführt werden und die angenommenen Pigmentabsorptionen solange variiert werden, bis eine optimale Übereinstimmung mit allen beobachteten REPs erzielt wird. Als Kontrolle muß dann die Superposition der so gewonnenen Einzelpigmentabsorptionen mit dem *in vivo* Absorptionsspektrum verglichen werden.

Dieses Verfahren wäre besonders im Fall der *Kieselalgen* interessant. Wie bereits eingangs erwähnt ist die *in vivo* Beobachtung des Hilfspigments Chl c in *Diatomeen* noch schwieriger als im Fall des Chl b der *Grünalgen*. Abb. 7.7 zeigt einen Ausschnitt des *in vivo* Absorptionsspektrums von *Phaeodactylum*

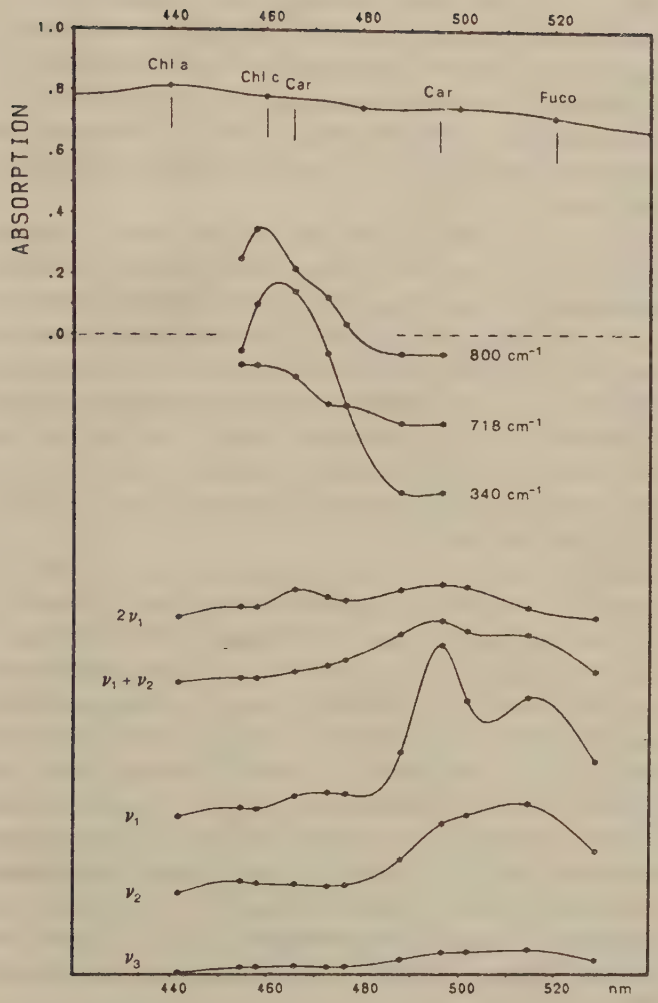
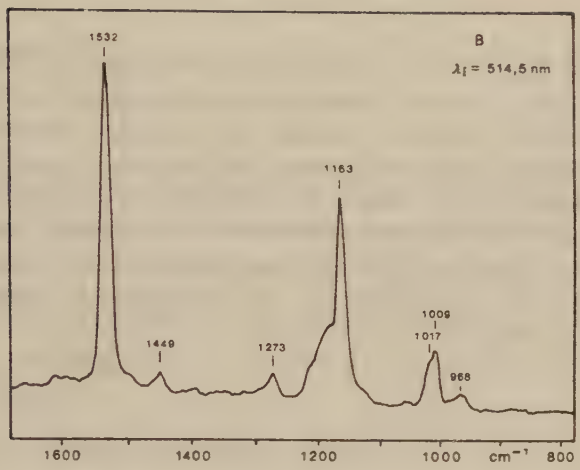


Abb. 7.7.: oberer Teil: Ausschnitt aus dem Absorptionsspektrum von Phaeodactylum tricornutum registriert bei 100 K;
unterer Teil: REPs von Chl c- und Carotinoid-Linien aus RR-Spektren von Phaeodactylum tricornutum bei 81 K.

tricornutum (Abb. 6.7) im Bereich der Soret – Absorption. Darunter sind wieder Anregungsprofile der Chloroplastenpigmente aufgetragen, welche aus 11 verschieden angeregten RR – Spektren ermittelt wurden. Für Chl c ergibt sich aus den Anregungsprofilen der Raman – Frequenzen 340, 718 und 800 cm^{-1} eine *in vivo* Absorption um 460 nm. Sie fällt mit dem 0 – 1 Übergang des β – Carotin zusammen und läßt sich damit aus dem *in vivo* Absorptionsspektrum nicht eindeutig bestimmen.

Wie in Abb. 7.4. für *Chlorella* lassen sich die REPs des β – Carotins identifizieren. Die Maxima treten jedoch weniger deutlich hervor. Außerdem ist die Verbreiterung auf der langwelligen Seite des 0 – 0 Übergangs (498 nm) ausgeprägter. Der Grund liegt in einer anderen Carotinoid – Zusammensetzung der *Kieselalgen*. Ihr β – Carotin – Gehalt ist gegenüger den *Grünalgen* deutlich kleiner. Anstelle des Luteins als wichtigstem Carotenol bei *Chlorella*, enthält *Phaeodactylum* Fucoxanthin und Diadinoxanthin. Jeffrey (1968) hat die Pigmentkonzentration in *Phaeodactylum* quantitativ bestimmt. Er gibt für den Carotin – , Diadinoxanthin – und Fucoxanthin – Gehalt Werte von 42, 36 und 52 µg pro 0.1 ml Zellvolumen an.

Die Fucoxanthin – Absorption ist *in vivo* an einer Schulter um 545 nm (Abb. 6.7) zu erkennen. Gegenüber *in vitro* (452 nm in Äthanol nach Strain et al. 1944) tritt eine starke Verschiebung auf, die auf Pigment – Protein Bindungen zurückgeführt wird (Govindjee und Braun 1974). So verschwindet beispielsweise die 545 nm *in vivo* Bande, wenn *Kieselalgen* kurzzeitig (10 sec) auf 340 K erhitzt werden. Dabei werden wahrscheinlich die Pigment – Protein Bindungen aufgehoben ohne jedoch das Fucoxanthin zu zerstören (Goedheer 1970). Im Fluoreszenzaktionsspektrum von *Braunalgen* bei 77 K tritt neben der Carotin-Bande (495 nm) und der Fucoxanthin – Bande (545 nm) noch ein Maximum bei 520 nm auf (Goedheer 1970). Es wird dem Fucoxanthin zugeordnet und könnte sich in den Anregungsprofilen der Carotinoid – Grundschwingungen (Abb. 7.7) andeuten. Abbildung 7.8 zeigt die Veränderungen im RR – Spektrum von *Phaeodactylum* beim Übergang von 496.5 zu 514.5 nm Anregung, welche diese Vermutung stützen.



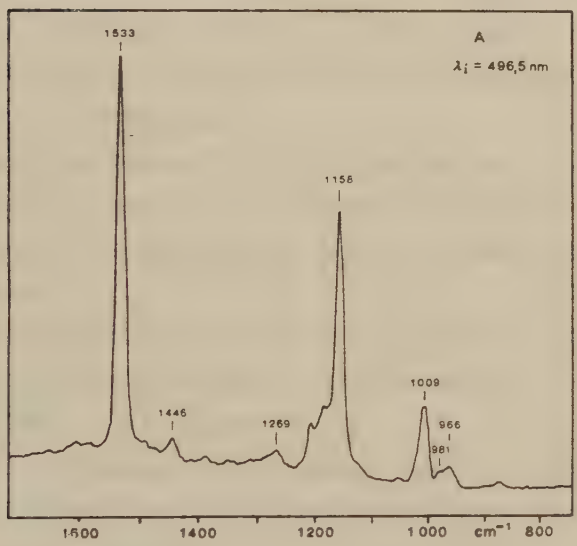


Abb. 7.8.: Vergleich der RR-Spektren von Phaeodactylum tricornutum mit 496,5 nm (A) und 514,5 nm (B) Anregung, T = 86 K, I_i = 100 mW, I_{sm} = 16400 cps, ZK = 2 sec , Frequenzangaben ± 4 cm^{-1}.

An dieser Stelle könnten *in vitro* Raman – Messungen an Fucoxanthin einiges zur Klärung beitragen. Soweit dem Verfasser bekannt ist, sind dazu bisher keine Arbeiten erschienen. Daneben ließe sich die Aussagekraft der in Abb. 7.6 dargestellten REPs durch bessere Anregungsmöglichkeiten der RR-Spektren wesentlich erhöhen. Speziell die Art der Bindung des Fucoxanthin an die Antennenkomplexe und dessen Veränderung bei kurzzeitigen Temperaturbelastungen der *Kieselalgen* – Zellen wäre ein interessanter Untersuchungsgegenstand von *in vivo* RR – Experimenten mit durchstimmbarer Anregung im Bereich 500 – 560 nm.

Literaturverzeichnis

Abe, M., Kitagawa, T., und Kyogoku, Y. (1978), J. Chem. Phys. 69,4526

Albrecht, A.C. (1961), J. Chem. Phys.34,1476

Albrecht, A.C., und Hutley, M.C. (1971), J. Chem. Phys. 55,4438

Batchelder, D.N., und Bloor, D. (1984),"Advances in Infrared and Raman Spectroscopy", R.J.H. Clark und R.E. Hester eds., (Wiley Heyden) Vol. 11,133

Behringer, J. (1958), Z. Elektrochem. 62,906

Behringer, J. (1967), "Raman Spectroscopy" H.A. Szymanski ed., (Plenum Press,New York),168

Bernstein, H.J. (1979), Phil. Trans. R. Soc. London A293,287

Brahma, S.K., Hargraves, P.E., Howard, jr. W.F., und Nelson, W.H. (1983), Appl. Spectrosc. 37,55

Brandmüller, J., und Schrötter, H. (1957), Z. Physik 149,131

Brandmüller, J.. und Moser, H. (1962), "Einführung in die Raman-spektroskopie", H. Kriegsmann und G. Matz eds., (Steinkopff Verlag, Darmstadt),56

Brunner, H., Mayer, A., und Sussner, H. (1972), J. Mol. Biol. 70,153

Butler, W.L., Tredwell, C.J., Malkin, R., und Barber, J. (1979), Biochim. Biophys. Acta 545,309

Butler, W.L., und Kitajima, M. (1975), Biochim. Biophys. Acta 396,72

Champion, P.M., und Albrecht, A.C. (1979), J. Chem. Phys. 71,1110

Champion, P.M., und Albrecht, A.C. (1980), J. Chem. Phys. 72,6498

Champion, P.M., und Albrecht, A.C. (1981), Chem. Phys. Lett. 82,410

Cho, F., und Govindjee (1970), Biochim. Biophys. Acta 216,139

Choi, S., Spiro, T.G., Langry, K.C., und Smith, K.M. (1982a), J. Am. Chem. Soc. 104, 4337

Choi, S., Spiro, T.G., Langry, K.C., Smith, K.M., Budd, D.L., und La Mar, G.N. (1982b), J. Am. Chem. Soc. 104,4345

Claes, H. (1954), Naturforsch. 9b,461

Collins, D.W., Fitchen, D.B., und Lewis, A. (1973), J. Chem. Phys. 59,5714

Colthup, N.B., Daly, L.H., Wiberly, S.E. (1975), "Introduction to IR and Raman Spektroscopy", (Acad. Press, New York), 246

Del Giudice, E., Doglia, S., und Milani, M. (1981), Physica Scripta 23,307

Dellepiane, G., Piseri, L., Tubino, R., und Mulazzi, E. (1982), J. Raman Spectrosc. 13,153

Desbois, A., Henry, Y., und Lutz, M. (1984 a), Biochim. Biophys. Acta 785,148

Desbois, A., Mazza, G., Stetzkowski, F., und Lutz, M. (1984b), Biochim. Biophys. Acta 785,161

Dougherty, R.C., Strain, H.H., Svec, W.A., Uphaus, R.A. und Katz, J.J. (1966), J. Am. Chem. Soc. 88,5037

Dougherty, R.C., Strain, H.H., Svec, W.A., Uphaus, R.A. und Katz, J.J. (1970), J. Am. Chem. Soc. 92,2826

Drissler, F. (1980), Phys. Lett. 77A,207

Drissler, F. (1981), "Collective Phenomena", Vol. 3,147

Drissler, F., und Macfarlane, R.M. (1978), Phys. Lett. 69A,65

Dunn, J.B.R., Shriver, D.F., und Klotz, I.M. (1973), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70,2582

Emerson, R., und Lewis, C.M. (1942), J. Gen. Physiol. 25,579

v. Euler, H., und Hellström, H. (1932), Z. Phys. Chem. B 15,342

Friedmann, J.M., und Hochstrasser, R.M. (1973), Chem. Phys. 1,457

Fröhlich, H. (1977), Riv. Nuovo Cimento 7,399

Gadzhiev, Z.I., Godzhaev, N.M., Gorokhov, V.V., Churin, A.A., Paschenko, V.Z., und Rubin, L.D. (1981), Dokl. Akad. Nauk SSSR 261,193

Gill, D., Kilponen, R.G., Rimai, L. (1970), Nature 227,743

Goedheer, J.C. (1966), "The Chlorophylls", L.P. Vernon und G.R. Sealy eds., (Acad. Press, New York) 147

Goedheer, J.C. (1969), Biochim. Biophys. Acta 172,252

Goedheer, J.C. (1970), Photosynthetica 4,97

Goodwin, T.W. (1971),"Aspects of Terpenoid Chemistry and Biochemistry", T.W. Goodwin, ed., (Acad. Press, New York) 315

Gouterman, M. (1959), J. Chem. Phys. 30,1139

Gouterman, M. (1961), J. Mol. Spectrosc. 6,138

Gouterman, M., Wagniere, G.H., und Snyder, L.C. (1963), J. Mol. Spectrosc. 11,108

Govindjee und Zilinskas Braun, B. (1974), "Algal Physiology and Biochemistry", W.D.P. Stewart ed., (Univ. of California Press, Berkeley), 346

Govindjee, und Govindjee, R. (1974), Sci. Am. 231,68

Hassing, S. und Sonnich Mortensen, O. (1980), J. Chem. Phys. 73,1078

Hayashi, H., Saito, S., und Tasumi, M. (1985), J. Raman Spectrosc. 16,27

Herzberg, G., und Teller, E. (1933), Z. Phys. Chem. B. 21,558

Herzfeld, K.F. (1924), Z. Phys. 23,341

Hinkle, P.C., und Mc Carty, R.E. (1978), Sci. Am. 238,104

Hizhnyakov, V. und Tehver, I. (1967), Phys. Stat. Sol. 21,755

Ho, Z.Z., Hanson, R.C., und Lin, S.H. (1982), J. Chem. Phys. 77,3414

Inagaki, F., Tasumi, M., und Miyazawa, T. (1974), J. Mol. Spektrosc. 50,286

Jackson, J.D. (1975), "Classical Elektrodynamics",2nd ed. (John Wiley, New York)

Jeffrey, S.W. (1968), Biochim. Biophys. Acta 162,271

Jeffrey, S.W. (1969), Biochim. Biophys. Acta 177,456

Junge, W. (1977), Ann. Rev. Plant. Physiol. 28,503

Kiefer, W. (1977), "Advances in Infrared and Raman Spectroscopy" Vol. 3, R.J.H. Clark und R.E. Hester eds., (Heyden & Son),1

Kiefer, W., und Bernstein, H.J. (1971 a), Appl. Spectrosc. 25,500

Kiefer, W., und Bernstein, H.J. (1971 a), Appl. Spectrosc. 25,609

Kiefer, W., und Topp, J.A. (1974), Appl. Spectrosc. 28,26

Kiefer, W., Schmid, W.J., und Topp, J.A. (1975), Appl. Spectrosc. 29,434

Kinoshita, S., Hirata, K., und Kushida, T. (1980), J. Phys. Soc. Japan 49,314

Kitagawa, T., Abe, M., und Ogoshi, H. (1978), J. Chem. Phys. 69,4516

Koyama, Y., Kito, M., Takii, T., Saiki, K., Tsuhida, K., und Yamashita, J. (1982), Biochim. Biophys. Acta 680,109

Krinski, N.I. (1979), Pure Appl. Chem. 51,649

Lippert, J.L. und Peticolas, W.L. (1971), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68,1572

Longuet - Higgins, H.C., Rector, C.W., und Platt, J.R. (1950), J. Chem. Phys. 18,1174

Lutz, M. (1972), C.R. Acad. Sc. Paris B 275,497

Lutz, M. (1974), J. Raman Spektrosc. 2,497

Lutz, M. (1977), Biochim. Biophys. Acta 460,408

Lutz, M. (1979), "These de Doctorat d'Etat",Universite Pierre et Marie Curie, Paris

Lutz, M. (1980), Proc. 7th Int. Conf. Raman Spektrosc. (North – Holland Pub., Amsterdam), 520

Lutz, M. (1984),"Advances in Infrared and Raman Spektroscopy", R.J.H. Clark und R.E. Hester eds. (Wiley Heyden) Vol 11,211

Lutz, M., und Breton, J. (1973), Biochem. Biophys. Res. Com. 53,413

Lutz, M., Kleo, J., Gilet, R., Henry, M., Plus, R., und Leickman, J.P. (1975), "Proc.2nd intern. Conf.on Stable Isotopes", E.R. Klein und P.D. Klein eds., (US Dept.of Commerce, Springfield), 462

Lutz, M., Kleo, J., und Reiss – Husson, F. (1976), Biochem. Biophys. Res. Comm. 69,711

Mathis, P., und Paillotin, G., (1981), "Photosynthesis", M.D. Hatch und N.K. Boardmann eds., (Academic Press, New York), 97

Meeks, J.C. (1974), "Algal Physiology and Biochemistry" W.D.P. Stewart ed., (Univ.of California Press, Berkeley),161

Murata, N., Troughton, J.H., und Fork, D.C. (1975), Plant. Physiol. 56,508

Nafie, L.A., Pezolet, M., und Peticolas, W.L. (1973), Chem. Phys. Lett. 20,563

Ogoshi, H., Saito, Y., und Nakamoto, K. (1972), J. Chem. Phys. 57,4194

Okamoto, H., Saito, S., Hamaguchi, H., Tasumi, M., und Eugster, C.H. (1984), J. Raman Spectrosc. 15,331

Pink, D.A., Trevor, J.G. und Chapman, D. (1981), Biochemistry 20,6692

Placzek, G. (1934), "Handbuch der Radiologie", E. Marx eds., (Akad Verlagsges., Leipzig) Bd.6,205

Platt, J.R. (1953), J. Opt. Soc. Am. 43,252

Rabinowitch, E., und Govindjee (1969), "Photosynthesis" (John Wiley, New York), 233

Raman, C.V. (1928), Nature 121,619

Saito, S., Tasumi, M., und Eugster, C. (1983 a), J. Raman Spectrosc. 14,299

Saito, S., und Tasumi, M. (1983 b), J. Raman Spectrosc. 14,310

Scheiwe, M.W., Körber, C., Schwindke, P., Chmiel, H., und Rau, G. (1978), Chemie – Ing. Technik 50,236

Scheiwe, M.W., und Schindke, P. (1978), Biomed. Techn. 23,144

Schlele, N. (1985), Diplomarbeit am Institut für Med. Optik der Univ. München

Schlösser, U.G. (1982), Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. 95,181

Schwarze, P., und Frandsen, N.O. (1960), Naturwiss. 2,47

Shorygin, P.P. (1947), Z. physik. Chem. UdSSR 21,1125

Shriver, F.D., und Dunn, J.B.R. (1974), Appl. Spectrosc. 28,319

Siebrand, W., und Zgierski, M.Z. (1984), J. Chem. Phys. 81,185

Sonnich Mortensen, O. (1971), Mol. Phys. 22,179

Sonnich Mortensen, O., und Hassing, S. (1980), "Advances in Infrared and Raman Spectroscopy", R.J.H. Clark und R.E. Hester eds., (Wiley Heyden) Vol. 6,1

Spiro, T.G., und Strekas, T.C. (1972), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69,2622

Spiro, T.G., und Strekas, T.C. (1974), J. Am. Chem. Soc. 96,338

Sponer, H., und Teller, E. (1941), Rev. Mod. Phys. 13,75

Srivastava, R.B., Pace, C., und Yu, N. - T. (1981), J. Raman Spectrosc. 11,20

Stallard, B.R., Callis, P.R., Champion, P.M. und Albrecht, A.C. (1984), J. Chem. Phys. 80,70

Strain, H.H., Manning, W.M., und Hardin, G. (1944), Biol. Bull. 86,169

Strekas, T.C., Adams, D.H., Packer, A., und Spiro T.G. (1974), Appl. Spectrosc. 28,324

Strekas, T.C., und Spiro, T.G. (1972), Biochim. Biophys. Acta 263,830

Sufra, S., Dellepiane, G., Masetti, G., und Zerbi, G. (1977), J. Raman Spectrosc. 6,267

Sunder, S., und Bernstein, H.J. (1976), J. Raman Spectrosc. 5,351

Suschtschinskij, M.M. (1974), "Ramanspektren von Molekülen und Kristallen", H. Kriegsmann ed., (Heyden & Son, Rheine), 11

Suschtschinskij, M.M., und Zubov, V.A. (1962), Opt. Spektrosk. 13,766

Szalontai, B., und Csatorday, K., (1980), J. Mol. Struct. 60,269

Tang, J., und Albrecht, A.C. (1970), "Raman Spectroscopy", H.A. Szymanski ed., (Plenum Press, New York), Vol.2,33

Tasumi, M., Inagaki, F., und Miyazawa, T. (1973), Chem. Phys. Lett. 22,515

Tonks, D., und Page, J.B. (1979 a), Bull. Am. Phys. Soc. 24,341

Tonks, D., und Page, J.B. (1979 b), Chem. Phys. Lett. 66,449

Verma, A.L., und Bernstein, H.J. (1974), J. Chem. Phys. 61, 2560

Wagner, W. - D. (1986), J. Raman Spectrosc.17,51

Wagner, W. - D., und Waidelich, W. (1986), Appl. Spectrosc. 40,191

Webb, S.J., Stoneham, M.E., und Fröhlich, H. (1977), Phys. Lett. 63A,407

Yu, N.-T., und Srivastava, R.B. (1980), J. Raman Spectrosc. 9,166

Zimmerer, N., und Kiefer, W. (1974), Appl. Spectrosc. 28,279

Anhang A: Fortran – Programm zur Berechnung von REPs

Das unten aufgeführte Computerprogramm TREPS ist in Fortran 77 verfaßt. In dieser Version lief es fehlerfrei an der CYBER 875 des Leibniz – Rechenzentrums der Bayerischen Akademie der Wissenschaften. Das Programm bestimmt im ersten Teil die experimentellen Raman – Anregungsprofile aus den Meßwerten I_{pj} und I_R mit Korrektur der Reabsorption nach (40). Dabei wird die spektrale Empfindlichkeit des Detektorsystems (Abb. 4.2) berücksichtigt. Der zweite Teil enthält die Berechnung der REPs aus dem gemessenen Absorptionsspektrum nach den Gleichungen (20,21,22), bzw. (37) und (38) für den Oberton $2\nu_1$ und die Kombinationsbande $\nu_1 + \nu_2$. Die graphische Darstellung der Ergebnisse (Abb. 7.4) wird durch das Unterprogramm ZEICHN von einem HP7470A Tischplotter ausgeführt.

```
************************************************************************ *****
      PROGRAM TREPS(WEIN,WERTE,ZZZG67,OUTPUT,TAPE4=WEIN,TAPE5=WERTE,
     *TAPE67=ZZZG67,DEBUG=OUTPUT)
*************************************************************************
C     PROGRAMMBESCHREIBUNG: TREPS BERECHNET DIE ANREGUNGSPROFILE MIT DEN
C         DATEN AUS DEN RR-SPEKTREN UND  KORRIGIERT DIE REABSORPTION.
C         DAZU WERDEN M STÜTZSTELLEN FÜR DAS ABSORPTIONSSPEKTRUM
C         WL(M) UND Y(M) EINGEGEBEN UND DIE GESUCHTEN ABSORPTIONSWERTE
C         DURCH KUBISCHE SPLINES (E01BAF AUS NAG) INTERPOLIERT.
C         DIE SPEKTRALE EMPFINDLICHKEIT DES DETEKTORSYSTEMS
C         WIRD KORRIGIERT.ZUSÄTZLICH WERDEN DIE REPS AUS DEM
C         ABSORPTIONSSPEKTRUM BERECHNET UND MIT DEN MEßWERTEN
C         VERGLICHEN.
      DIMENSION WL(141),Y(141),WRK(862),KJA(15)
      DIMENSION ERR(11),MRR(0:15),MRE(15),RIN(11,15),REF(11,15),EXWO(11)
      DIMENSION ORR(11,15),REP(11,15)
      DIMENSION TREP(141,15),ARE(141,0:15),AIM(141,0:15)
      DIMENSION AREX(141,6),AIMX(141,6)
      DIMENSION W(3000),IW(1200),F3(5)
      DIMENSION EX9(17),EN9(17),KE9(21),CE9(21),WEK9(118)
      DIMENSION EX8(17),EN8(17),KE8(21),CE8(21),WEK8(118)
      REAL KE8,KE9
      EXTERNAL FINT
      REAL K(145)
      INTEGER M,LCK,LWRK,IFAIL,JFAIL
      INTEGER ME8,LEK8,LERK8,IFEL8
      INTEGER ME9,LEK9,LERK9,IFEL9
      CHARACTER PROBE*100,ABSO*100,INTER*6
      COMMON M4,K,C(145),WS,MIN
C     VARIABLENBEZEICHNUNG:
C              WL,Y = STÜTZSTELLEN FÜR ABSORPTIONSSPEKTRUM
C           K,C,WRK = B-SPLINE ARRAYS
C              SVAL = INTERPOLIERTER EXTINKTIONSWERT AN DER STELLE XVAL
C            ERR(I) = ERREGERWELLENLÄNGEN
C   RIN(I,J),WRR(I)
C   REF(I,J),WRE(J) = INTENSITÄTEN UND WELLENZAHLEN DER RR- UND
C                     DER REFERENZLINIEN
C         IMAX,JMAX = REP-MAXIMUM ZUR NORMIERUNG
C               NCR = ANZAHL DER AUSGEWERTETEN RR-LINIEN
C          ORR(I,J) = UNKORRIGIERTE UND UNNORMIERTE REPS
C          REP(I,J) = KORRIGIERTE UND NORMIERTE REPS
C        PROBE,ABSO = BESCHRIFTUNG
C            KJA(I) = ZUORDNUNG ZWISCHEN RR-UND REFERENZINTENSITÄTEN
C              IREV = WELLENLÄNGE DES INTENSITÄTSVERGLEICHS REPS
C               ANL = NULLLINIE DES ABSORPTIONSSPEKTRUMS
C          ARE(I,J) = REALTEIL VON A(0,0),BZW A(0,1)
C          AIM(I,J) = IMAGINÄRTEIL VO A(0,0),BZW A(0,1)
C         TREP(I,J) = THEORETISCHES ANREGUNGSPROFIL
C               A,B = INTEGRATIONSGRENZEN
C        W,IW,LW,LIW = ARBEITSSPEICHER FÜR INTEGRATION MIT DIMENSIONS (L)
C      EPSREL,EPSABS = GEWÜNSCHTE FEHLERGRENZE,RELATIV,ABSOLUT FÜR INTEGRAL
C             ABSERR = TATS. FEHLERABSCHÄTZUNG
C             POINTS = SINGULARITÄT DES INTEGRANDEN
C               FINT = INTEGRAND ALS EXTERNE FUNKTION DEFINIERT
C             IGRAPH = ZEICHNE SPLINES DURCH GEM REPS(0),BZW.
C                      GERECHNETE REPS(1) MIT MESSPUNKTEN
C                MIN = PARAMETER DER DEN NENNER DES INTEGRANDEN
C                      IN DER EXTERNEN FUNKTION FINT FESTLEGT
C    EN8,EX8,EN9,EX9 = STÜTZSTELLEN FÜR SPEKTRALE EMPFINDLICHKEIT
C                      WAHLBEREICH 8 UND 9
      DATA NFAIL,IFAIL,IFE8,IFEL8,IFE9,IFEL9/0,0,0,0,0,0/
      DATA IREV,INTER,PI/3,'INTERN',3.14/
      DATA F1,F,NER,ERR/1.E3,1.E7,11,441.6,454.5,457.9,465.8,472.7,
     *476.5,488.0,496.5,501.7,514.5,528.7/
```

```
      DATA EX9/416.92,432.79,448.55,464.31,480.01,495.61,
     +500.83,506.,511.21,516.37,521.57,526.72,531.91,
     +542.24,557.72,573.11,593./
      DATA EN9,ME9/1.05,1.18,1.37,1.54,1.6,1.67,1.69,1.75,1.46,
     +1.23,1.13,1.11,1.19,1.57,1.95,2.05,1.78,17/
      DATA EX8/554.96,570.55,586.,596.24,601.38,606.46,611.58,616.7,
     +621.76,626.87,637.02,647.17,662.36,677.62,692.91,708.23,723.67/
      DATA EN8,ME8/.82,.85,.837,.79,.8,.53,.34,.3,.36,.51,.8,.95,
     +.99,.97,.91,.83,.75,17/
      DATA A,B,NPTS,LW,LIW/380.,660.,1,1000,400/
      DATA EPSAP,EPSRP/1.E-3,1.E-3/
      DATA EPSABP,EPSREP/1.E-3,1.E-3/
      DATA EPSABM,EPSREM/1.E-3,1.E-3/
      DATA EPSIL/0.1/
      DATA F2/6.5618391/
      READ(4,*) PROBE,IMAX,JMAX
      READ(4,*) NCR,(MRR(I),I=1,NCR)
      READ(4,*) NCE,MRE
      READ(4,*) ((RIN(I,J),I=1,11),J=1,NCR)
      READ(4,*) ((REF(I,J),I=1,11),J=1,NCE)
      READ(4,*) KJA
      READ(4,*) ABSO,ANL
      READ(4,*) M,Y
      READ(4,*) F3
      LCK=M+4
      M4=M+4
      LEK9=ME9+4
      LERK9=6*ME9+16
      LEK8=ME8+4
      LERK8=6*ME8+16
      MIN=1
      IGRAPH=1
      NT1=41
      NT2=101
      LWRK=6*M+16
      DO 113 L=1,M
      Y(L)=Y(L)-ANL
      IF(Y(L).LT.0.) Y(L)=0.
113   CONTINUE
      I=1
      WL(I)=340.
      DO 100 I=1,140
      WL(I+1)=340.+I*2
100   CONTINUE
      WRITE(5,1) PROBE,NER,NCR,NCE
1     FORMAT('1',6X,A///3X,I2,' = ANZAHL DER ERREGERLINIEN'/3X,I2,
     +' = ANZAHL DER AUSGEWERTETEN RR-LINIEN'/3X,I2,' = ANZAHL DER AUS
     +GEWERTETEN REFERENZLINIEN'///)
22    WRITE(5,2) (ERR(N),N=1,11)
2     FORMAT(5X,'RR-INTENSITITEN'//10X,11(F6.1,2X),' CM-1'/100('-')//)
      WRITE(5,20) (MRR(J),(RIN(I,J),I=1,11),J=1,NCR)
20    FORMAT(([4,3X,'!',3X,11(F6.1,2X)/))
      WRITE(5,3) (MRE(J),(REF(I,J),I=1,11),J=1,NCE)
3     FORMAT(5X,'REFERENZ-INTENSIT[TEN'//(I4,3X,'!',3X,11(F6.1,2X)/))
      IF(IKOR-1)23,24,24
23    CALL E01BAF(ME9,EX9,EN9,KE9,CE9,LEK9,WEK9,LERK9,IFEL9)
      CALL E01BAF(ME8,EX8,EN8,KE8,CE8,LEK8,WEK8,LERK8,IFEL8)
C     BERECHNUNG DER B-SPLINES F]R SPEKTRALE EMPFINDLICHKEIT
      DO 114 I=1,11
      DO 115 J=1,NCR
      XVE=F/(F/ERR(I)-MRR(J))
      IF(XVE.LT.593.)THEN
      CALL E02BBF(ME9+4,KE9,CE9,XVE,SVE,IFE9)
      ELSE
```

```
      CALL E02BBF(ME8+4,KE8,CE8,XVE,SVE,IFE8)
      END IF
      RIN(I,J)=RIN(I,J)/SVE
115   CONTINUE
      DO 116 J=1,NCE
      XVE=F/(F/ERR(I)-MRE(J))
      IF(XVE.LT.593.)THEN
      CALL E02BBF(ME9+4,KE9,CE9,XVE,SVE,IFE9)
      ELSE
      CALL E02BBF(ME8+4,KE8,CE8,XVE,SVE,IFE8)
      END IF
      REF(I,J)=REF(I,J)/SVE
116   CONTINUE
114   CONTINUE
      WRITE(5,21)
21    FORMAT(5(/),'MIT KORREKTUR DER SPEKTRALEN EMPFINDLICHKEIT',//)
      IKOR=1
      GOTO 22
24    WRITE(5,7)
7     FORMAT(5(/),5X,'ZUORDNUNG DER REFERENZLINIEN'//10X,
     +'PIGMENT',4X,'REFERENZ'/50('-')/)
      KJMAX=KJA(JMAX)
      DO 102 J=1,NCR
      KJ=KJA(J)
      G1=REF(IREV,KJ)/REF(IREV,KJMAX)
      DO 101 I=1,11
      ORR(I,J)=(RIN(I,J)/REF(I,KJ))*G1
101   CONTINUE
      WRITE(5,70) MRR(J),MRE(KJ)
70    FORMAT(12X,I4,8X,I4/)
102   CONTINUE
      WRITE(5,9)ERR(IREV)
9     FORMAT(5(/),10X,'REFERENZINTENSITITEN BEZOGEN AUF ',F6.1,' NM '
     +,'SPEKTRUM FIR VERGLEICH DER REPS')
      WRITE(5,4) (ERR(N),N=1,11)
4     FORMAT(5(/),5X,'UNKORRIGIERTE REPS'//10X,11(F6.1,2X),' CM-1'/
     +100('-')/)
      WRITE(5,40) (MRR(J),(ORR(I,J),I=1,11),J=1,NCR)
40    FORMAT((I4,3X,'!',3X,11(F6.2,2X)/))
      WRITE(5,5) ABSO,(WL(I),Y(I),I=1,M)
5     FORMAT(5(/),4X,A//4X,6(2X,'NM',4X,'EXT',8X)/100('-')/
     +(4X,6(F6.1,2X,F8.3,5X)/))
      WRITE(5,11) ANL
11    FORMAT(///5X,'EIN NULLWERT VON ',F7.3,' WURDE ABGEZOGEN')
C     BERECHNUNG DER B-SPLINES
      CALL E01BAF(M,WL,Y,K,C,LCK,WRK,LWRK,IFAIL)
C     BERECHNUNG DES INTERPOLATIONSWERTS FIR WO=XVAL
      DO 104 I=1,11
      XVAL=ERR(I)
      IF((340..LT.XVAL).AND.(XVAL.LT.610.))THEN
      CALL E02BBF(M+4,K,C,XVAL,SVAL,IFAIL)
      ELSE
      SVAL=0.
      END IF
      EXWO(I)=SVAL
104   CONTINUE
      DO 105 J=1,NCR
      KJ=KJA(J)
      DO 106 I=1,11
      XVAL= (1/ERR(I))*F-MRR(J)
      OM4=(1/ERR(I))*F-MRE(KJ)
      OM4=(OM4/XVAL)**4
      XVAL=(1/XVAL)*F
      IF((340..LT.XVAL).AND.(XVAL.LT.610.))THEN
```

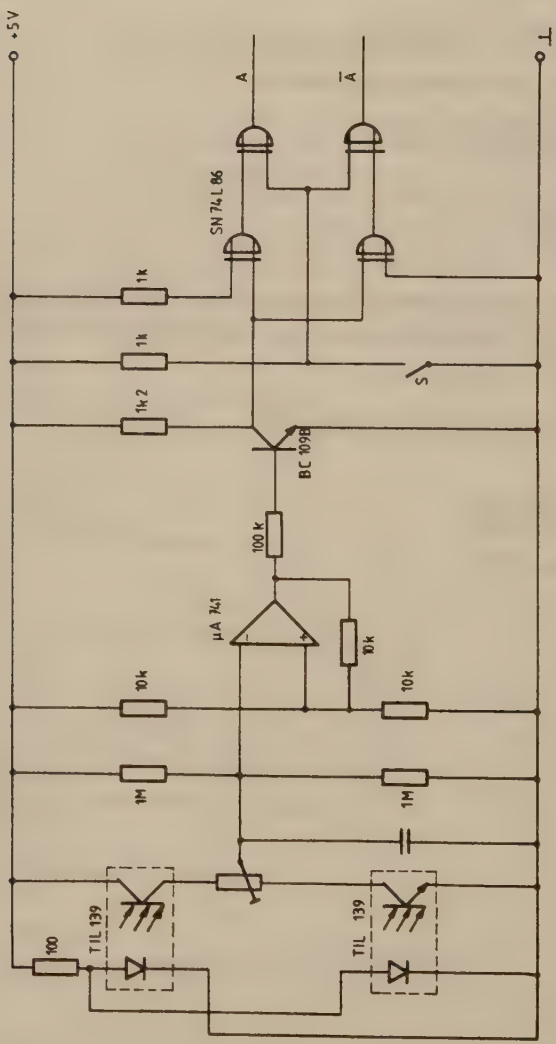
```
      CALL E02BBF(M+4,K,C,XVAL,SVAL,IFAIL)
      ELSE
      SVAL=0.
      END IF
      EXW=EXWO(I)+SVAL
      IF(ABSO.EQ.INTER) EXW=1.
      REP(I,J)=QRR(I,J)*OM4*EXW
106   CONTINUE
105   CONTINUE
      G=100/REP(IMAX,JMAX)
      DO 107 J=1,NCR
      IF(J.EQ.4)G=G*3.7
      IF(J.EQ.5)G=G*1.
      DO 108 I=1,11
      REP(I,J)=REP(I,J)*G
108   CONTINUE
107   CONTINUE
      WRITE(5,6) ERR(IMAX),MRR(JMAX),G
6     FORMAT(5(/),5X,'REPS MIT REABSORPTIONSKORREKTUR NORMIERT AUF 100
     +BEI ',F5.1,' NM FJR DIE ',I4,' CM-1 RR-LINIE'//5X,'NORMIERUNGS
     +FAKTOR G = ',G11.5//)
      WRITE(5,60) (ERR(N),N=1,11)
60    FORMAT(10X,11(F6.1,2X),'CM-1'/100('-')/)
      WRITE(5,61) (MRR(J),(REP(I,J),I=1,11),J=1,NCR)
61    FORMAT((I4,3X,'!',3X,11(F6.1,2X)/))


      DO 130 J=0,NCR
      DO 120 I=NT1,NT2
      IF(J.EQ.0)THEN
      WS=WL(I)
      ELSE
      WS=F/WL(I)-MRR(J)
      WS=F/WS
      END IF
      CALL D01AJF(FINT,A,B,EPSAP,EPSRP,RESUP
     +,ABSEP,W,LW,IW,LIW,JFAP)
C   BERECHNET DAS INTEGRAL JBER DEN NICHTRESONANTEN NENNER
      MIN=-1
      CALL D01AJF(FINT,A,WS-EPSIL,EPSABM,EPSREM,RESULM,
C    BERECHNET INTEGRAL JBER RESONANTEN NENNER VON LINKS
     +ABSERM,W,LW,IW,LIW,JFAIM)
      CALL D01AJF(FINT,WS+EPSIL,B,EPSABP,EPSREP,RESULP,
C    BERECHNET INTEGRAL JBER RESONANTEN NENNER VON RECHTS
     +ABSERP,W,LW,IW,LIW,JFAIP)
      ARE(I,J)=(RESULM+RESULP-RESUP)/(2*WS)
      IF((340..LT.WS).AND.(WS.LT.610.))THEN
      CALL E02BBF(M+4,K,C,WS,VAL,NFAIL)
C   BERECHNET IMAGINIRTEIL AN DER STELLE WS
      ELSE
      VAL=0.
      END IF
      AIM(I,J)=VAL*PI/(2*WS)
      IF(J.EQ.0.)THEN
      GOTO 99
      END IF
      IF((J.GT.0).AND.(J.LT.4))THEN
      AREX(I,J)=(ARE(I,0)-ARE(I,J))*F1
      AIMX(I,J)=(AIM(I,0)-AIM(I,J))*F1
      END IF
      IF(J.EQ.4)THEN
      AREX(I,4)=(ARE(I,0)-ARE(I,2)-ARE(I,3)+ARE(I,4))*F1
      AIMX(I,4)=(AIM(I,0)-AIM(I,2)-AIM(I,3)+AIM(I,4))*F1
      END IF
      IF(J.EQ.5)THEN
      AREX(I,5)=(ARE(I,0)-2*ARE(I,3)+ARE(I,5))*F1
```

```
      AIMX(I,5)=(AIM(I,0)-2*AIM(I,3)+AIM(I,5))*F1
      END IF
      TREP(I,J)=(AREX(I,J)**2+AIMX(I,J)**2)*F3(J)
99    MIN=1
120   CONTINUE
130   CONTINUE
      DO 131 J=1,NCR
      WRITE(5,14) MRR(J),(WL(I),TREP(I,J),I=NT1,NT2)
14    FORMAT(5(/),I4,/(3X,5(F7.1,2X,G10.4,4X)/))
131   CONTINUE
      CALL ZEICHN(WL,Y,M,ERR,REP,TREP,MRR,NCR,PROBE,IGRAPH,NT1,NT2)
      END
*************************************************************
      SUBROUTINE ZEICHN(WL,Y,M,ERR,REP,TREP,MRR,NCR,PROBE,IGRAPH,
     +NT1,NT2)
*************************************************************
C     GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES ABSORPTIONSSPEKTRUMS UND DER
C     RAMAN ANREGUNGSPROFILE (REPS)
      CHARACTER PROBE*100
      DIMENSION WL(141),Y(141),ERR(11),REP(11,15),TREP(141,15),
     +MRR(15),P(2),Q(2),YR(11),YTR(141),A(2)
      CALL SHEET(0.7,270,390)
C     ZEICHNUNG ABSORPTION
      CALL WINDOW(40,230,250,350)
      READ(4,*) A,NL
      US1=WL(NT1)
      US2=WL(NT2)
      CALL USCALE(US1,US2,0,A(1),A(2),0)
      CALL WINDOW(0,270,0,390)
      CALL MOVETO(US1,A(2)+((A(2)-A(1))/3))
      WRITE(67,10) PROBE
10    FORMAT(4X,A)
      CALL LINTYP(3,'- F')
      CALL XGRID(0.)
      CALL LINTYP(3,'-F')
      CALL WINDOW(40,230,250,350)
      P(1)=US1
      P(2)=A(1)
      Q(1)=P(1)
      Q(2)=A(2)
      CALL LINAX(P,Q,A(1),A(2),'ABSORPTION',10,4,5)
      P(1)=US1+20
      P(2)=A(2)
      Q(1)=US2-20
      Q(2)=A(2)
      CALL LINAX(P,Q,US1+20,US2-20,' ',0,1,5)
      L=(WL(M)-WL(1))/M
      CALL CURVEX(NT1,NT2,WL,Y,'NSPLNT1',165,L)
C     ZEICHNUNG REPS
      CALL WINDOW(40,230,40,350)
      CALL SELECT(4)
      CALL FRAME
      CALL SELECT(1)
      CALL USCALE(US1,US2,0,0.,500.,0)
      P(1)=US1+20
      P(2)=0.
      Q(1)=US2-20
      Q(2)=0.
      CALL LINAX(P,Q,US1+20,US2-20,'WELLENLINGE',11,-1,5)
      DO 111 J=1,NCR
      N1=0
      N2=11
      DO 110 I=1,11
      IF ((REP(I,J).GT.0.).AND.(N1.EQ.0)) N1=I
```

```
      YR(I)=REP(I,J)
      YTR(I)=TREP(I,J)
      IF ((N1.GT.0).AND.(REP(I,J).EQ.0.)) N2=I
110   CONTINUE
      DO 113 I=NT1,NT2
      YTR(I)=TREP(I,J)
113   CONTINUE
      IF (IGRAPH.EQ.1) THEN
      CALL CURVE(NT1,NT2,WL,YTR,'LINEAR')
      ELSE
      CALL CURVE(N1,N2,ERR,YR,'NSPLN1')
      END IF
      DO 112 I=N1,N2
      CALL MOVETO(ERR(I),YR(I))
      CALL MARK(174)
112   CONTINUE
      L=J*NL
      IF(J.GT.2)L=J*NL+40
      CALL USCALE(US1,US2,0,-L,500.,-L,0)
111   CONTINUE
      RETURN
      END
*************************************************************
      REAL FUNCTION FINT(X)
*************************************************************
      REAL K(145)
      COMMON M4,K,C(145),WS,MIN
      MFAIL=0
      IF((340..LT.X).AND.(X.LT.610.))THEN
      CALL E02BBF(M4,K,C,X,VAL,MFAIL)
      ELSE
      VAL=0.
      END IF
      IF(MIN.GT.0)THEN
      FINT=VAL/(X+WS)
      ELSE
      FINT=VAL/(X-WS)
      END IF
      RETURN
      END
```

Anhang B: Schaltplan zur Kanalumschaltung des Photonenzählers



Herrn W. Waidelich danke ich für die Anregung zur vorliegenden Arbeit und für sein stetes Interesse am Fortgang der Untersuchungen, die er großzügig unterstützte.

Mein Dank gilt auch Herrn J. Brandmüller. Er stellte nicht nur einen gut ausgestatteten Laborraum, in dem die Raman-Experimente durchgeführt werden konnten, zur Verfügung, sondern nahm auch regen Anteil am Verlauf dieser Arbeit.

Wertvolle Anregungen und experimentelle Tips verdanke ich Herrn H.W. Schrötter

Herrn H. Scheer bin ich für die Überlassung einer Chlorophyll c Probe zu großem Dank verpflichtet.

Schließlich danke ich den Mitarbeitern am Institut für Medizinische Optik, die mich durch ihr Interesse an dieser Arbeit sehr unterstützten, besonders Herrn J. Spahn, der in zahlreichen Diskussionen gute Ideen beisteuerte und Frau I. Mahler, die mir bei der Erstellung des Manuskripts und der Textverarbeitung bereitwillig half.

Ein Großteil der Streuexperimente wurde mit einem Ar^+-Laser durchgeführt, den die Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München dankenswerterweise zur Verfügung gestellt hatte.

Der Bayerischen Akademie der Wissenschaften danke ich für die Bereitstellung von Rechenzeit im Leibniz-Rechenzentrum.

Lebenslauf

3.10.1953	geboren in Gelsenkirchen – Buer als Sohn des Diplom – Chemikers Dr. Fritz Wagner und dessen Ehefrau Isolde, geb. Günther
1959 – 1963	Besuch der Volksschule Garching/Alz
1963 – 1972	Besuch des Ruperti – Gymnasiums Mühldorf/Inn
Juni 1972	Reifeprüfung
7.1972 – 7.1974	Wehrdienst
1974 – 1980	Physik – Studium an der Ludwig – Maximilians – Universität München
4.8.1980	Diplomhauptprüfung mit Nebenfach Genetik, Thema der unter Anleitung von Dr. R. Claus am Lehrstuhl von Prof. J. Brandmüller durchgeführten Diplomarbeit: "Über die gitterdynamischen Aspekte nichtlinearer Frequenzmischung von CO_2 – und Kr^+ – Laser – strahlung in piezoelektrischen Kristallen"
1.1 – 15.4.1981	Mitwirkung am Aufbau eines Raman – Labors als Mitglied des "Instituto de Ciencias" der "Universidad Autonoma de Puebla" in Puebla, Mexico
1.7 – 31.12.1981	Privatarbeitsvertrag mit Dr. R. Claus, Berechnungen von Raman – Streuintensitäten der Polaritonen in Halbleitern im Rahmen eines DFG – Projekts
seit 1.1.1982	wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Medizinische Optik, Beginn der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit.